

Aus der Klinik für Innere Medizin I
mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Ernährungs- und Altersmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Schreiber)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Differentielle Induzierung der Ausschüttung
pro- und anti-inflammatorischer Zytokine durch verschiedene
probiotische Bakterien**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Verena Rohleder

aus Pinneberg

Kiel 2014

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Ulf Helwig

2. Berichterstatter Prof. Dr. P. Rosenstiel

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2016

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 05.10.2015

gez.: Prof. Dr. Matthias Laudes

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	7
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	7
1.1.1 Colitis ulcerosa	8
1.1.2 Morbus Crohn	9
1.1.3 Pouchitis	10
1.2 Aktuelle Therapiekonzepte	11
1.2.1 Colitis ulcerosa	11
1.2.1.1 Konservative Therapie	11
1.2.1.2 Chirurgische Therapie	12
1.2.2 Morbus Crohn	12
1.2.2.1 Konservative Therapie	12
1.2.2.2 Interventionelle Therapie	13
1.2.2.3 Chirurgische Therapie	13
1.2.3 Pouchitis	13
1.3 Probiotika	13
1.4 Pathogenese der CED	15
1.4.1 Umweltfaktoren	15
1.4.2 Genetische Faktoren	17
1.4.3 Mikrobielle Antigene	18
1.4.4 Zusammenfassung Pathogenese	20
1.5 Immunologie	21
1.5.1 Immunologische Abläufe im Gastrointestinaltrakt	21
1.5.2 Das anti-inflammatorische Zytokin Interleukin-10	22
1.5.3 Die pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-1 beta und Tumornekrosefaktor alpha	24
1.5.3.1 Interleukin-1 beta (IL-1 β)	24
1.5.3.2 Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)	25
1.6 Fragestellung und Hypothesen	26

2	Methoden	27
2.1	Aufbau der Studie	27
2.2	Probenmaterial	27
2.3	Auftrennung der peripheren Blutmonozyten (PBMNC)	27
2.4	Bakterien und Kulturbedingungen	28
2.5	Inkubation der Bakterien mit peripheren Blutmonozyten	29
2.6	Quantifizierung der Zytokine im Kulturüberstand	30
2.7	Statistische Auswertung	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Stimulation mit LPS und ohne LPS/Probiotika	32
3.2	Interleukin-1 β (IL-1 β)	32
3.2.1	IL-1 β -Produktion der PBMNC nach Inkubation mit Zelltrümmern	32
3.2.2	IL 1 β -Produktion der PBMNC nach Inkubation mit Zellextrakt	34
3.2.3	Zusammenfassung der IL 1 β -Produktion von PBMNC nach Inkubation	35
3.3	Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)	37
3.3.1	TNF- α -Produktion der PBMNC nach Inkubation mit Zelltrümmern	37
3.3.2	TNF- α -Produktion der PBMNC nach Inkubation mit Zellextrakt	38
3.3.3	Zusammenfassung der TNF- α -Produktion der PBMNC nach Inkubation	39
3.4	Interleukin-10 (IL-10)	41
3.4.1	IL-10-Produktion der PBMNC nach Inkubation mit Zelltrümmern	41
3.4.2	IL-10-Produktion der PBMNC nach Inkubation mit Zellextrakt	42
3.4.3	Zusammenfassung der IL-10-Produktion durch PBMNC nach Inkubation	43
3.5	Vergleich der Stimulation mit LPS vs. Probiotika	45
4	Diskussion	48
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	48
4.2	Einordnung in die Literatur	50
4.3	Interpretation der Ergebnisse	51
4.4	Limitationen	56
4.5	Schlussfolgerung	59
5	Zusammenfassung	61
6	Literaturverzeichnis	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Untersuchte Bakterienstämme	29
Tabelle 2: IL-1 β -Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Zelltrümmern	33
Tabelle 3: IL-1 β -Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Zellextrakt	34
Tabelle 4: TNF- α -Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Zelltrümmern	37
Tabelle 5: TNF- α -Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Zellextrakt	38
Tabelle 6: IL-10-Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Zelltrümmern	41
Tabelle 7: IL-10-Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Zellextrakt	42

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: IL-1 β -Produktion nach Inkubation mit Zelltrümmern	36
Abbildung 2: IL-1 β -Produktion nach Inkubation mit Zellextrakt	36
Abbildung 3: TNF- α -Produktion nach Inkubation mit Zelltrümmern	40
Abbildung 4: TNF- α -Produktion nach Inkubation mit Zellextrakt	40
Abbildung 5: IL-10-Produktion nach Inkubation mit Zelltrümmern	44
Abbildung 6: IL-10-Produktion nach Inkubation mit Zellextrakt	44
Abbildung 7: Relative anti-inflammatorische Kapazität der einzelnen Probiotika. Dargestellt ist die relative anti- vs. pro-inflammatorische Stimulationskapazität aller untersuchten Probiotika für die Stimulation der PBMNC mit Zelltrümmern in einer Konzentration von 10^7 CFU/ml für TNF- α und IL-1 β getrennt.	46
Abbildung 8: Relative anti-inflammatorische Kapazität der einzelnen Probiotika. Dargestellt ist die relative anti- vs. pro-inflammatorische Stimulationskapazität aller untersuchten Probiotika für die Stimulation der PBMNC mit Zellextrakten in einer Konzentration von 10^7 CFU/ml für TNF- α und IL-1 β getrennt.	46
Abbildung 9: Relative anti-inflammatorische Kapazität der einzelnen Probiotika. Dargestellt ist die relative anti- vs. pro-inflammatorische Stimulationskapazität aller untersuchten Probiotika zusammengefasst in Familien für die Stimulation der PBMNC mit Zelltrümmern in einer Konzentration von 10^7 CFU/ml für TNF- α und IL-1 β getrennt.	47
Abbildung 10: Relative anti-inflammatorische Kapazität der einzelnen Probiotika. Dargestellt ist die relative anti- vs. pro-inflammatorische Stimulationskapazität aller untersuchten Probiotika zusammengefasst in Familien für die Stimulation der PBMNC mit Zellextrakten in einer Konzentration von 10^7 CFU/ml für TNF- α und IL-1 β getrennt.	47

1 Einleitung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) mit den beiden idiopathischen Hauptformen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn sind als Erkrankungen des zwanzigsten Jahrhunderts anzusehen, die in Industrienationen besonders häufig auftreten. Es handelt sich häufig um schwere Krankheitsbilder, die insbesondere auch junge Menschen sowohl durch den entzündlichen Befall als auch die medikamentösen und operativen Therapien stark in ihrer Lebensqualität einschränken. Trotz umfangreicher Ursachenforschung ist die genaue Pathogenese der Erkrankungen nach wie vor nicht ganz geklärt. Eine verbreitete Theorie ist die inadäquate Immunantwort gegen intraluminale Bakterien. Besonderes Augenmerk liegt daher auf der Therapie mit probiotischen Bakterien. Diese konnten in klinischen Studien über ebenfalls noch nicht vollständig verstandene Mechanismen gute Erfolge vor allem in der Remissionserhaltung der CED erwirken, ohne den Patienten durch zusätzliche Nebenwirkungen sowie aufwendige Prozeduren oder Applikationen zu belasten. Um die Mechanismen der Wirksamkeit weiter zu ergründen und eine Basis für weitere Forschung und Optimierung der derzeit vorhandenen Therapiemöglichkeiten zu bilden, wurde die hier vorgestellte Studie entwickelt und durchgeführt. Mit ihrer Hilfe wurde die Wirksamkeit verschiedener Probiotika auf entzündliche Prozesse in einem In-vitro-Modell geprüft.

Im Folgenden sollen zunächst die Grundlagen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie der derzeit gängigen Therapiekonzepte und verwendeten Therapeutika dargelegt werden. Weiter werden die aktuellen Theorien zur Pathogenese und den grundlegenden immunologischen Vorgängen im Bereich des Gastrointestinaltraktes vorgestellt. Auf dieser Basis erfolgt später die Darstellung und Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Studie.

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Der Begriff der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen umfasst verschiedene Formen einer nicht infektiösen Entzündung des Gastrointestinaltraktes. Diese unterscheiden sich in vielen Aspekten wie histologischem Bild, Läsionsort, Verlauf, Therapieoptionen etc., scheinen jedoch auch Gemeinsamkeiten gerade im Bereich der Ätiologie bzw. Pathogenese zu haben. Unter dem Oberbegriff CED werden in erster Linie die idiopathischen Formen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn zusammengefasst. Des Weiteren gehört die sogenannte Pouchitis

dazu, eine spontan rezidivierende, nicht infektiöse Entzündung eines ileoanal Pouches nach Kolektomie. Zudem können auch einige nicht infektiöse Colitiden, wie zum Beispiel die lymphozytäre und die mikroskopische Colitis, zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gezählt werden.

1.1.1 Colitis ulcerosa

Bei der Colitis ulcerosa handelt es sich um eine entzündliche Erkrankung des Darmes, die sich in ihrer Ausbreitung fast ausschließlich auf den Dickdarm beschränkt und sich vom distalen Rektum aus kontinuierlich nach proximal im Kolon ausbreitet. In 25–50 % der Fälle ist nur das Rektosigmoid betroffen, bei 50–70 % auch die linke Kolonhälfte und bei ca. 25 % handelt es sich um eine Pankolitis; in seltenen Fällen ist das terminale Ileum als sogenannte Backwash-Ileitis betroffen (Nikolaus et Schreiber, 2007). Morphologisches Korrelat der entzündlichen Erkrankung sind Ulzerationen der oberflächlichen Schleimhautschichten mit Fibrinbelägen und Kontaktblutungen sowie typischen Kryptenabszessen durch Granulozyteninfiltration im akuten Stadium. Im Verlauf zeigt sich eine Schleimhautatrophie mit Verlust des normalen Faltenreliefs und Pseudopolypen, die erhaltenen Schleimhautinseln entsprechen (Tanaka et al., 1999). Die Diagnostik umfasst neben der Anamnese und klinischen Untersuchung eine komplette Ileokoloskopie mit Stufenbiopsien aus mindestens fünf verschiedenen Kolonabschnitten inklusive Rektum. Zudem sind Laboruntersuchungen wie Entzündungsparameter und eine bakteriologische Stuhluntersuchung zum Ausschluss einer infektiösen Kolitis (Nikolaus und Schreiber 2007) durchzuführen. Als Leitsymptome gelten blutig-schleimige Diarrhöen und Tenesmen. Als Komplikationen im Verlauf können extraintestinale Symptome an Haut, Augen, Gelenken und inneren Organen auftreten. Bei Beginn der Erkrankung in der Kindheit können Wachstumsstörungen die Folge sein. Massive enterale Blutungen und eine toxische Dilatation des Kolons mit der Gefahr der Sepsis und Perforation mit Peritonitis sind als akute Komplikationen möglich. Die wichtigste Komplikation der Colitis ulcerosa ist jedoch das mit dem Ausmaß der Kolonbeteiligung und der Dauer der Erkrankung korrelierende Karzinomrisiko auf dem Boden der durch die chronische Entzündung entstehenden Epitheldysplasien, die als Vorläufer einer karzinomatösen Entartung wirken (Ekblom et al., 1990).

In der überwiegenden Zahl nimmt die Erkrankung einen chronisch-rezidivierenden oder intermittierenden Verlauf mit auf akute Exazerbation folgender kompletter Remission. Es finden sich jedoch auch ein chronisch-kontinuierlicher Verlauf ohne komplette Remissionen sowie ein akuter fulminanter Verlauf, der mit einer hohen Letalität verbunden ist (Solberg et al., 2009).

1.1.2 Morbus Crohn

Bei Morbus Crohn handelt es sich um eine nicht infektiöse, entzündliche Darmerkrankung. Sie ist durch eine diskontinuierliche Ausbreitung mit möglicher Lokalisation vom Mund bis zum Anus, auch bis in die tieferen Wandschichten des Gastrointestinaltraktes, charakterisiert. Überwiegend zeigt sich die entzündliche Veränderung jedoch im Bereich des terminalen Ileums und proximalen Kolons, was der Erkrankung auch den Namen Ileitis terminalis einbrachte. In 24–40 % der Fälle kommt es dabei zu einem isolierten Befall des Ileums, in etwa 15–25 % des Kolons und in 40–45 % zu einem Befall von Ileum und Kolon. Im Dünndarm ist von 1–10 % auszugehen, die sonstigen Abschnitte des Magen-Darm-Traktes sind deutlich seltener betroffen (Nikolaus et Schreiber, 2007). Morphologisch ist die Erkrankung durch eine transmurale, das heißt die gesamte Darmwand durchdringende Entzündung in den segmental betroffenen Darmabschnitten charakterisiert. Diese geht mit einer ödematösen und fibrotischen Verdickung der Darmwand sowie segmentalen Ulzerationen und Stenosen, dem typischen „Pflastersteinrelief“, einher (Nikolaus et Schreiber, 2007). Histologisch lassen sich Epitheloidzellgranulome und mehrkernige Riesenzellen nachweisen. In vielen Fällen finden sich eine Hyperplasie der zugehörigen Lymphknoten sowie eine Lymphangiektasie und die für die Erkrankung ebenfalls typischen aphthenähnlichen Schleimhautschädigungen mit Ausbildung von Fissuren und Fisteln. Zur Diagnostik gehören neben Anamnese und klinischer Untersuchung zwingend die Ileokoloskopie und der Nachweis der für den Morbus Crohn typischen makroskopischen Befunde. Eine endoskopische und bildgebende Diagnostik wie MRT oder Sonografie des gesamten Verdauungstraktes bezüglich weiterer Manifestationsorte kann sich gegebenenfalls anschließen. Auch beim Morbus Crohn dienen laborchemische Untersuchungen der Diagnosefindung; weiter ist der Ausschluss einer infektiösen Darmerkrankung mittels bakteriologischer Stuhl Diagnostik notwendig. Zu den Leitsymptomen des Morbus Crohn gehören Abdominalschmerzen, die häufig der Klinik einer akuten Appendizitis ähnlich sind, sowie Diarrhöen, die im Gegensatz zur Colitis ulcerosa häufig ohne Blutbeimengung

auftreten. Als Komplikationen können ähnlich wie bei der Colitis ulcerosa extraintestinale Manifestationen auftreten. Zudem finden sich Wachstumsstörungen und Malabsorptionssyndrome. In ca. 40 % der Fälle finden sich, oft auch als Erstmanifestation im Bereich des Anus, Fistelbildung und anorektale Abszesse. Zudem kann es zum Auftreten von Darmstenosen bis hin zum Ileus kommen. Das Karzinomrisiko ist deutlich geringer als bei der Colitis ulcerosa und nur bei starkem Kolonbefall und in lange Zeit bestehenden Fisteln erhöht (Maykel et al., 2006). Zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes liegen mehrere Aktivitätsindizes vor.

1.1.3 Pouchitis

Der Begriff Pouchitis beschreibt eine unspezifische, idiopathische Entzündung im Bereich des ilealen Reservoirs nach totaler Proktokolektomie mit Ileum-Pouch-Anal-Anastomose (IPPA). Diese operative Therapie ist seit nunmehr fast zwei Jahrzehnten die Standardprozedur bei der Colitis ulcerosa (Gionchetti et al., 2003) und wird bei bis zu 10–20 % der Colitis-Patienten aufgrund refraktärer Verläufe oder maligner Schleimhautveränderungen durchgeführt. Die Pouchitis gehört zu den häufigsten Langzeitkomplikationen der Pouch-Chirurgie bei der Colitis ulcerosa (Sandborn WJ, 1994) und muss deshalb im Rahmen der CED Erwähnung finden. Meist tritt eine Pouchitis innerhalb des ersten Jahres nach dem operativen Eingriff auf. Es werden jedoch bei den Betroffenen auch Latenzen von bis zu mehreren Jahren beobachtet. Die Inzidenz ist aufgrund verschiedenster Diagnosekriterien der Pouchitis und großer Differenzen in den Nachsorgeuntersuchungen nach Operation nur sehr variabel angegeben, sie liegt in einem Bereich von 20–50 % (Setti-Carraro et al., 1994; Stahlberg et al., 1996; Romanos et al., 1997; Keranen et al., 1997; Meagher et al., 1998; Hurst et al., 1998). Die Ursache der Pouchitis ist ebenso wie die von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn nicht vollständig geklärt. Eine Colitis ulcerosa als Vorgeschichte und eine veränderte Bakterienkonstellation im ilealen Pouch scheinen jedoch wichtige Faktoren zu sein (Ruseler-van-Emden et al., 1994), was durch den meist positiven Effekt von Antibiotika noch gestützt wird (Sandborn et al., 1994; Keighley MRB, 1996; Nicholls et Banerjee, 1998).

Klinisch kann sich eine Pouchitis durch verschiedene Symptome wie zum Beispiel eine erhöhte Stuhlfrequenz und flüssige Konsistenz, rektale Blutabgänge, abdominelle Krämpfe, Tenesmen, Inkontinenz, leichtgradiges Fieber und extraintestinale Manifestationen bemerkbar machen (Lohmuller et al., 1990; Madden et al., 1990). Die klinische Diagnose einer Pouchitis sollte jedoch durch Endoskopie und Histologie bestätigt werden. Hier zeigen sich das Bild

eines Erythems und Ödems der Schleimhaut sowie Petechien, Granulationen, ein Verlust der vaskulären Zeichnung, Erosionen und oberflächliche Ulzerationen (Tytgat et van Deventer, 1988). Histologisch lassen sich akute entzündliche Infiltrate mit Kryptenabszessen (ähnlich der Kryptenabszesse bei Colitis ulcerosa) und Ulzerationen zusätzlich zu Zeichen einer chronischen Entzündung mit Zottenatrophie und Hyperplasie der Krypten in fast allen Bereichen der Schleimhaut nachweisen (Moskowitz et al., 1986, Sheperd et al., 1987). Die Pouchitis kann in den meisten Fällen erfolgreich therapiert werden, in ca. 5–15 % kommt es jedoch zu einer therapierefraktären oder einer rekurrenten Pouchitis. Man unterscheidet hier zum einen die rekurrente Pouchitis mit mehr als zwei Episoden pro Jahr nach jeweils gutem Ansprechen auf die Therapie und zum anderen die chronische Pouchitis, bei der es eine behandlungssensitive Form mit Auftreten der Symptome nur bei Absetzen der Therapie und eine behandlungsrefraktäre Form ohne jegliches Ansprechen auf Therapie gibt (Gionchetti et al., 2000).

1.2 Aktuelle Therapiekonzepte

Im Folgenden werden die derzeit gängigen Therapiekonzepte der CED in Berufung auf die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen kurz dargestellt (Dignass et al., 2011).

1.2.1 Colitis ulcerosa

Für die Behandlung der Colitis ulcerosa stehen aktuell sowohl konservative als auch chirurgische Therapiekonzepte zur Verfügung.

Konservative Therapie

Die konservative Therapie umfasst zum einen eine Substitutionstherapie bei Mangelzuständen, gegebenenfalls auch eine temporäre Sondenernährung oder parenterale Ernährung, sowie die medikamentöse Therapie. Hierfür können heute das Mesalazin (5-ASA) als Standardtherapie der Colitis ulcerosa sowie topische und systemisch wirkende Kortikoide und Immunsuppressiva im Falle hoch akuter Schübe oder therapierefraktärer Verläufe eingesetzt werden. Als dem 5-ASA in der Effektivität gleichwertiges Therapeutikum wird zudem Mutaflor® (*E. coli Nissle*) in der Remissionserhaltung eingesetzt. Die medikamentöse Therapie wird in Form einer Stufentherapie abhängig vom Schweregrad der Symptomatik angewendet.

Chirurgische Therapie

Zu den akuten Operationsindikationen bei der Colitis ulcerosa zählen die fulminant verlaufende Kolitis mit Sepsis, die toxische Kolondilatation sowie die Perforation und die schwere oder lebensbedrohliche Blutung. Hierbei wird aufgrund der relativ hohen Letalität ein dreizeitiger Eingriff mit zunächst subtotaler Kolektomie unter Belassen des Rektumstumpfes sowie Schleimfistel und endständigem Ileostoma und erst später die Anlage eines ileoanal Pouches durchgeführt. Ein passageres Ileostoma wird bei jeder Pouch-OP für 3–6 Monate zum Schutz des Pouches gelegt. Zu den elektiven Operationsindikationen zählen schwere rezidivierende Krankheitsschübe, eine deutliche Verschlechterung des Allgemeinzustandes des Patienten unter der Erkrankung, lokale oder systemische Komplikationen, Kontraindikationen gegen eine medikamentöse Langzeittherapie und der Nachweis einer Epitheldysplasie. Aufgrund der unzureichenden Erfolgsrate bei Teilkolektomie wird hier direkt die Proktokolektomie mit kontinenzerhaltender ileoanaler Pouch-Operation empfohlen. Im Gegensatz zum Krankheitsbild des Morbus Crohn ist bei der Colitis ulcerosa hierdurch eine Heilung zu erreichen.

1.2.2 Morbus Crohn

Es folgt eine kurze Darstellung der aktuellen konservativen, interventionellen und chirurgischen Therapiekonzepte des Morbus Crohn.

Konservative Therapie

Für die dem Schweregrad der Schübe und dem Krankheitsverlauf angepasste medikamentöse Therapie stehen neben Mesalazin sowohl topische als auch systemische Corticosteroide zur Verfügung. Auch Immunsuppressiva und die relativ neuen TNF-Antikörper wie z. B. Infliximab® und Adalimumab® werden angewendet. Zur konservativen Therapie von Fisteln werden Antibiotika wie Metronidazol und/oder Ciprofloxacin sowie Azathioprin und bei Therapierefraktärität TNF-Antikörper angewendet. Zur konservativen Therapie zählt ähnlich wie bei der Colitis ulcerosa eine an den Krankheitsverlauf angepasste Ernährung bis hin zu ballaststofffreier Kost im akuten Schub, passagerer parenteraler Ernährung bei hoch akutem Verlauf sowie Substitution bei Mangelsyndromen. Wie auch bei der Colitis ulcerosa ist eine psychosomatische Therapie und Begleitung der Patienten aufgrund der in die Lebensqualität stark eingreifenden Erkrankung in den meisten Fällen notwendig.

Interventionelle Therapie

Für die Symptomatik der segmentalen Stenosierungen des Darmlumens durch die entzündlichen Wandveränderungen kann durch die endoskopische Ballondilatation der stenosierte Abschnitte ein guter Therapieerfolg unter Vermeidung eines chirurgischen Eingriffes erwirkt werden. Auch Fisteln lassen sich mit der sog. Clip- oder Loop-Technik endoskopisch verschließen (Miehsler et Gasche, 2003).

Chirurgische Therapie

Im Gegensatz zur Colitis ulcerosa ist eine Heilung des Morbus Crohn durch einen operativen Eingriff nicht möglich. Deshalb gilt der Grundsatz, eine darmerhaltende Minimalchirurgie durchzuführen, deren Indikation allerdings nur bei Komplikationen besteht. Hierzu gehören als Akutindikation zum Beispiel die Darmperforation, die Peritonitis oder ein Ileus. Zu den elektiven Operationsindikationen zählen ein Subileus, rezidivierende Fisteln u. Ä. Um längerstreckige Resektionen und damit ein Kurzdarmsyndrom mit Mangelresorption, chologischen Diarrhöen und eine megaloblastäre Anämie aufgrund von Vitamin B 12-Mangel des meist betroffenen Ileums möglichst lange zu vermeiden, werden bei Stenosen Strikturoplastiken oder sehr sparsame Resektionen durchgeführt.

1.2.3 Pouchitis

Die Therapie der Pouchitis erfolgt im Wesentlichen antibiotisch. Das meistverwendete Antibiotikum stellt hier Metronidazol dar, aber auch andere Substanzen wie Ciprofloxacin, Amoxicillin/Clavulansäure, Erythromycin, Tetracyclin oder Rifaximin können wirksam sein. Zudem werden Corticosteroide, Cyclosporin, Azathioprin, Bismuth oder kurzkettige Fettsäuren angewendet (Sandborn et al., 1999).

1.3 Probiotika

Als eine schonende und mit wenig bis keinen Nebenwirkungen behaftete Therapieoption hat sich in den letzten Jahren besonders im Bereich der Remissionserhaltung eine Therapie mit sogenannten Probiotika etabliert. Bei Probiotika handelt es sich definitionsgemäß um lebende Mikroorganismen, die bei Aufnahme in angemessener Menge einen über den Effekt der basalen Ernährung hinausgehenden gesundheitsfördernden Effekt auf den Organismus haben (Schrezenmaier et de Vrese, 2001). Zu diesen Bakterien gehören zum Beispiel Lakto-

bakterien, Bifidobakterien, Streptokokken und bestimmte Stämme von *Escherichia coli* sowie nicht bakterielle Organismen wie *Saccharomyces boulardii*.

Die Wirksamkeit von *E. coli Nissle* in der Therapie der Colitis ulcerosa konnte bereits bewiesen werden (Rembacken et al., 1999; Kruis et al., 1997) und führte in Deutschland zu einer Zulassung bei Patienten mit einer Colitis ulcerosa und Mesalazin-Unverträglichkeit. Weitere vielversprechende Therapieansätze mit Probiotika zeigten Erfolge in der Behandlung einer experimentellen Colitis sowie bei der Remissionserhaltung der Colitis ulcerosa. So konnte eine probiotische Präparation genannt VSL#3, bestehend aus einer Mischung von acht verschiedenen Bakterienspezies in einer Konzentration von 300 Milliarden lebender Mikroorganismen pro Gramm erfolgreich in der Remissionserhaltung bei der Behandlung der chronischen Pouchitis (Gionchetti et al., 2000) angewendet werden. Gleiches gilt für die Remissionserhaltung bei Behandlung der Colitis ulcerosa (Venturi et al., 1999), die Prävention eines postoperativen Rückfalles bei Morbus Crohn (Gionchetti et al., 2000) sowie die Prävention des ersten Auftretens einer Pouchitis nach Operation (Gionchetti et al., 2002). VSL#3 zeigt somit eine therapeutische Effektivität bei jeder der drei zu den CED zählenden Erkrankungen.

Der spezifische Wirkungsmechanismus hinter diesen therapeutischen Effekten ist noch nicht vollständig aufgeschlüsselt. Es wird jedoch im Allgemeinen eine Alteration des darmeigenen Immunsystems zugunsten anti-inflammatorischer Effekte postuliert (Sartor, 2004; Fiocchi 1998). Bei CED konnten generell erniedrigte Konzentrationen des anti-inflammatorisch wirkenden Zytokins Interleukin-10 (IL-10) (Schreiber et al., 1995) sowie eine erhöhte Konzentration der pro-inflammatorisch wirkenden Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) (Schreiber et al., 1991; Reinecker et al., 1993) in Gewebe und peripheren Blutzellen akut erkrankter Patienten festgestellt werden. Im Rahmen einer Erhaltungstherapie mit dem bereits erwähnten VSL#3 bei chronischer Pouchitis ließen sich deutlich erhöhte Gewebekonzentrationen von IL-10, jedoch niedrig bleibende Konzentrationen von IL-1 und TNF- α nachweisen (Ullisse et al., 2001). Auf Basis dieser Feststellungen wurden die Effekte von Probiotika auf die Zytokinsynthese in verschiedenen Modellen untersucht. So wurde bewiesen, dass von genmanipulierten Bakterien produziertes IL-10 eine mit pro-inflammatorischen Zytokinen assoziierte toxische Colitis lindert (Steidler et al., 2000; Fiorucci et al., 2002). Zudem konnten in Untersuchungen mit IL-10-defizienten Mäusen (IL-10 knock out mice) interessante Fakten zur Immunologie und Probiotikawirkung

erbracht werden. So entwickelten IL-10-KO-Mäuse, die zuvor in sterilen Bedingungen gehalten wurden, erst eine histologisch dem Morbus Crohn ähnliche chronische Colitis, wenn die sterilen Bedingungen aufgehoben wurden (Kuhn et al., 1993). Wurden die Mäuse jedoch vor Beendigung der sterilen Bedingungen mit verschiedenen Laktobakterien gefüttert, konnte die chronische Entzündung verhindert werden (Madsen et al., 2000). Zudem kam es zu weiteren immunologisch günstigen Reaktionen wie der Reduktion der Metalloproteinase-Aktivität (Ullisse et al., 2001).

1.4 Pathogenese der CED

Die Pathogenese sowohl von Colitis ulcerosa als auch von Morbus Crohn und der Pouchitis ist jeweils noch nicht endgültig aufgedeckt und gegenwärtig weiterhin Objekt intensiver Forschung. Es wurden bislang sowohl für alle Erkrankungen aus dem CED-Formenkreis geltende Faktoren als auch für jede einzelne Erkrankung spezifische Faktoren der Krankheitsentstehung gefunden. Da es sich bei jeder Erkrankung um ein multifaktorielles Geschehen handelt, ist eine Darlegung der Pathogenese entsprechend schwierig und es sind viele Bereiche mit einzubeziehen.

1.4.1 Umweltfaktoren

So gehören zum Beispiel eine Reihe von Umweltfaktoren zu möglichen an der Entstehung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung beteiligten Faktoren: z. B. pränatale Ereignisse, Stillen des Kindes, Infektionen in der Kindheit, Kontakt mit mikrobiellen Antigenen, Einnahme oraler Kontrazeptiva, Hygiene, Klima, Umweltverschmutzung, Stress und Diät (Fiocchi C, 1998). Rauchen als Umweltfaktor hat in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung, da sich gegensätzliche Effekte für die Erkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nachweisen lassen. Bei Morbus Crohn stellt Rauchen ein zweifach erhöhtes Risiko für das Auftreten dar (Franceschi et al., 1987), bei der Colitis ulcerosa ist das Risiko einer Erkrankung für Raucher gegenüber Nichtrauchern deutlich geringer und sinkt weiter mit einer ansteigenden Anzahl von konsumierten Zigaretten (Lindberg et al., 1988). Dieser gegensätzliche Effekt eines Umweltfaktors auf die Entwicklung der beiden Krankheitsbilder ist bislang nicht aufgeklärt, weist jedoch auf Unterschiede in der Pathogenese der beiden Erkrankungen hin. Obwohl ein Zusammenhang zwischen der aufgenommenen Nahrung und CED aufgrund der Lokalisation der Erkrankung logisch erscheint und Defizite bei CED wie zum Beispiel Zinkmangel bei Morbus Crohn (Ainley et

al., 1991) dokumentiert sind, gibt es zum Stellenwert der Ernährung noch keine eindeutigen Daten.

Es wurde zudem ein fraglicher Zusammenhang zwischen Appendektomien und dem in Folge reduzierten Auftreten von Colitis ulcerosa diskutiert. Ein anscheinend protektiver Effekt einer Appendektomie fand sich jedoch nur, wenn sie aufgrund einer akuten Entzündung und vor dem 20. Lebensjahr durchgeführt wurde (Andersson et al., 2001).

Einen großen Stellenwert in der Diskussion um den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen nimmt die 1989 postulierte Hygienehypothese ein (Strachan DP, 1989). Ihre ursprüngliche Aussage besteht in der Annahme, dass offene oder inapparente Infektionen sowie unhygienischer Kontakt mit älteren Verwandten und somit eine Exposition gegenüber mikrobiellen Komponenten in der Kindheit einen Schutz vor der Entwicklung allergischer Erkrankungen bieten. Es wird davon ausgegangen, dass bei diesem Prozess vier verschiedene Faktoren interagieren: die Variabilität der möglichen allergischen Erkrankungen, der Zeitpunkt der Exposition, die Variabilität der möglichen umweltbedingten Expositionen und schließlich die genetisch bedingte Bereitschaft, auf diese Faktoren zu reagieren (von Mutius E, 2007). Bei der Entstehung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen geht man von einer Interaktion von genetischer Disposition und Umweltfaktoren aus, die die normale kommensale Darmflora so beeinflussen, dass eine inadäquate mucosale Immunreaktion resultiert (Molodecky et Kaplan, 2010). Eine allein genetisch bedingte Ursache erscheint vor dem Hintergrund einer steigenden Inzidenz der CED in einigen geografischen Regionen nicht wahrscheinlich (Mikhailov et Furner, 2009; Danese et al., 2004). Nachweisbar ist sowohl eine Zunahme der Inzidenz in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts in den aufstrebenden Industrienationen Nordamerikas und Europas als auch in den sich in den letzten Jahrzehnten industriell entwickelnden Nationen wie China und Indien (Zheng et al., 2005, Desai et Gupte, 2005). Deshalb wird ein Zusammenhang in der Entstehung mit steigenden Hygienestandards vermutet. Die Verbesserung sanitärer Anlagen und der Hygienestandards in Verbindung mit verringerter Exposition gegenüber möglichen Pathogenen könnte somit zu einer erhöhten Bereitschaft führen, eine inadäquate Immunantwort auf den Kontakt mit neuen Antigenen zu entwickeln und somit an CED zu erkranken (Gent et al., 1994). Es liegen inzwischen verschiedenste Studien zu den einzelnen im Rahmen der Hygienehypothese zu diskutierenden Faktoren vor, die diese Hypothese größtenteils stützen (Lashner et Loftus, 2006; Amre et al., 2006; Bernstein et al., 2006). Zu diesen Faktoren zählen beispielsweise die Infektion mit

Helicobacter pylori, Familiengröße, Geburtsreihenfolge, das Aufwachsen in städtischen oder ländlichen Regionen und die Tierexposition in der Kindheit.

1.4.2 Genetische Faktoren

Da sich die Umwelteinflüsse in ihrer Auswirkung auf die Krankheitsentwicklung nie strikt von den möglichen genetischen Faktoren trennen lassen, gibt es auch auf dem Gebiet der genetischen Faktoren noch viele offene Fragen. In mehreren Studien konnten genetische Varianzen unter unterschiedlichen ethnischen Gruppen aufgezeigt werden. So wurden CED im Vergleich weitaus häufiger in der jüdischen Bevölkerung und hier besonders in der Gruppe der Ashkenazi-Juden nachgewiesen (Roth et al., 1989; Ahmad et al., 2001). Zudem fanden sich in epidemiologischen Studien höhere Erkrankungsraten in der weißen Bevölkerung im Vergleich zu Afroamerikanern und Asiaten (Sandler R, 1994; Ahmad et al., 2001). Weiter ergaben Familienstudien, dass das Risiko an CED zu erkranken bei Kindern von an CED erkrankten Eltern von zwei- auf 13-fach im Vergleich zur Normalbevölkerung steigt. Bei der Colitis ulcerosa betrug die Erkrankungsrate bei Kindern von Betroffenen 6,26 %, bei Morbus Crohn 9,2 % (Orholm et al., 1999). In Zwillingsstudien konnte für Morbus Crohn eine Konkordanz von 20–50 % in monozygoten und von weniger als 10 % in heterozygoten Zwillingen ermittelt werden. Dies weist deutlich auf eine genetische Komponente in der Entstehung der Erkrankung hin. Für die Colitis ulcerosa stellte sich die genetische Komponente mit einer Konkordanz von 16 % bei monozygoten und 4 % bei heterozygoten Zwillingen nicht so ausgeprägt, aber dennoch relevant dar (Halme et al., 2006).

Zwar konnte nachgewiesen werden, dass genetische Faktoren eine wichtige Rolle in der Entstehung der CED spielen, der Nachweis eines spezifischen und alleinverantwortlichen Genlocus konnte bislang jedoch nicht erbracht werden.

Von besonderem Interesse ist der IBD1-Locus auf Chromosom 16, da er für Morbus Crohn spezifisch ist (Hugot et al., 1996). Hier konnten Assoziationen mit Mutationen eines Gens dieser Region nachgewiesen werden, das das Protein NOD2 (oder CARD15–*caspase activating recruitment domain*) codiert (Hugot et al., 2001; Hampe et al., 2001.). Es sind inzwischen über 30 verschiedene Mutationen des NOD2-Gens bekannt, wobei drei Hauptmutationen 82 % aller NOD2-Mutationen repräsentieren (Lesage et al., 2002). NOD2 gehört zu den zytoplasmatischen Proteinen und ist in der Lage, den NF- κ B-Signalweg zu aktivieren. Gleichzeitig scheint ihm jedoch auch eine große Bedeutung als intrazellulärer

Rezeptor bakterieller Antigene und hier insbesondere der Peptidoglykane, einem Hauptbestandteil der Zellwände grampositiver Bakterien, zuzukommen (Girardin et al., 2003). Gerade am Darmepithel lässt sich eine Bedeutung von NOD2 als intrazellulärer Rezeptor bakterieller Antigene vermuten, da aufgrund der hohen Bakterienkonzentration extrazelluläre Rezeptoren wie TLR2 negativ reguliert werden müssen (Philpott et al., 2001). Somit kommt es bei einer Mutation des NOD2-Genes zu einer zweifachen Funktionsstörung. Zum einen bei der intrazellulären Antigenerkennung und zum anderen bei der Regulation des NF- κ B-Signalweges. NOD2 wird nach Stimulation durch das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α in myeloiden Zellen und Darmepithelzellen aktiviert (Rosenstiel et al., 2003; Gutierrez et al., 2002). Deshalb kommt einer Mutation des NOD2-Genes im Kontext der bei CED am Darmepithel ablaufenden Entzündungsreaktion mit vermehrter Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine umso größere Bedeutung zu.

Neben dem NOD2-Genlocus konnten weitere Loci mit Assoziation zur Genese der CED identifiziert werden. So wurden neben einem Risiko-Haplotypen auf dem 5q31 (IBD5) Locus in Assoziation mit Morbus Crohn (Peltekova et al., 2004; Rioux et al., 2001) durch genomweite Assoziations-Scans (GWS) die Loci DLG5 (Stoll et al., 2004), TNFSF15 (Yamazaki et al., 2005), CARD4 (McGovern et al., 2005) IL-23R (Duerr et al., 2006) und ATG16L1 (Hampe et al., 2007) identifiziert. Mittels eines mehrstufigen genomweiten Assoziations-Scans, der 393 deutsche Patienten mit Morbus Crohn und 399 Kontrollpersonen einschloss, konnte 2007 ein weiterer Risiko-Genlocus auf Chromosom 11p15.1 mit der Bezeichnung NELL1 (nel-like 1 precursor-encoding gene) nachgewiesen werden (Franke et al., 2007).

Trotz aller Intensivierung der Forschung auf dem genetischen Sektor kann jedoch die enorme Zunahme der Inzidenz der CED in den letzten Jahrzehnten nicht allein auf genetische Veränderungen zurückzuführen sein. Dies betont nochmals den großen Stellenwert der Umweltfaktoren in der Krankheitsentstehung (Schreiber S, 2000).

1.4.3 Mikrobielle Antigene

Zu den mit Sicherheit wichtigsten und beachtenswertesten Faktoren in der Pathogenese der CED gehören mikrobielle Antigene. So wurde lange Zeit eine infektiöse Ätiologie mit einer direkten Ursache- und Effekt-Beziehung durch einen einzelnen Mikroorganismus diskutiert. Als Ursache der Entzündung wurde eine dysfunktionelle, jedoch initial angemessene

Immunreaktion auf ein infektiöses Agens postuliert und für den Morbus Crohn insbesondere *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Mendoza et al., 2009, Hansen et al., 2010) untersucht. Bei der Colitis ulcerosa galt das Augenmerk vor allem adhäsiven *E. coli*, *Fusobacterium varium* und *Bacillus*-Spezies (Ohkusa et al., 2004). Da alle Patienten mit CED erhöhte Antikörpertiter gegen Viren, Bakterien und Pilze aufweisen, erscheint der Versuch einer Antigenidentifizierung auf diesem Wege nicht zielführend. Auch die erhöhten Antikörpertiter von CED-Patienten gegenüber multiplen enterischen pathogenen Bakterien geben aufgrund einer sekundären Sensitivierung auf kreuzreagierende Antigene oder einer allgemein gesteigerten Immunaktivität keinen weiteren Aufschluss über das gesuchte Pathogen (Fiocchi C, 1998).

Interessanterweise wurde ein signifikant erhöhtes Risiko für die Ausbildung eines Morbus Crohn nach Masernexposition (Ekblom et al., 1994) und ein erhöhtes Risiko für CED nach Masernimpfung (Thompson et al., 1995) postuliert. Eine mögliche hiermit in Verbindung stehende vaskuläre Komponente der CED-Entstehung in Form einer granulomatösen Vaskulitis durch Paramyxovirus ähnliche Partikel wurde ebenfalls diskutiert (Wakefield et al., 1993). Sowohl die Rolle der Masern als auch die der Vaskulitis ließ sich jedoch nicht endgültig beweisen.

Neben der humoralen wurde auch die zellvermittelte Immunreaktion genauestens untersucht, wobei sich eine vermehrte T-Zell-Antwort der betroffenen Mucosa nachweisen ließ, die auf eine antigenspezifische Erkennung und einen Verlust der physiologischen Toleranz gegenüber der enterischen Darmflora hinweist (Pirzer et al., 1991).

Der Darmflora kommt wohl die größte Bedeutung in der Initiierung und Aufrechterhaltung der CED zu. So konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit einer aktiven CED im Vergleich zu denen mit einer inaktiven CED eine deutlich verringerte Konzentration gewisser anaerober Bakterien und *Lactobacillus*-Spezies in der intestinalen Mikroflora aufweisen (Fabia et al., 1993). So erscheint es möglich, dass Produkte der kommensalen Mikroflora bei beeinträchtigter mucosaler Barriere oder Verletzungen der Mucosa eine Entzündung initiieren können (Chadwick & Anderson, 1990). Normalerweise kommt der kommensalen Mikroflora die Aufgabe zu, die physiologische Entzündungsreaktion zu modulieren (Duchmann et al., 1995 und 1996). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei Patienten mit CED die mucosalen monozytären Zellen (LPMNC) bei Kontakt mit autologer intestinaler Mikroflora proliferieren. Mucosale Monozyten in nicht betroffenen Mucosa-Abschnitten oder bei

Patienten in Remission taten dies hingegen nicht. Periphere mononukleäre Zellen (PBMNC) gesunder Individuen proliferieren hingegen nur bei Kontakt mit Bakterien der heterologen Mikroflora. Diese Ergebnisse legen nahe, dass in Gesundheit eine immunologische Toleranz gegenüber der autologen, jedoch nicht gegenüber der heterologen Mikroflora vorliegt, die während der Entzündung verloren geht und somit zu einer chronischen Immunantwort auf die eigene Darmflora führen kann (Duchmann et al., 1995 und 1996).

Diese Kontakthypothese konnte in vivo am Menschen bestätigt werden. Bei Patienten, die eine divergierende Ileostomie mit Ausschaltung der normalen Stuhlpassage erhielten, verminderte sich die Entzündungsreaktion im umgangenen Segment, nach Reanastomose und erneutem Kontakt mit Darmbakterien kam es jedoch wieder zu einer Entzündungsreaktion (Rutgeerts et al., 1991).

Zudem konnte bei Patienten mit Morbus Crohn durch das Einbringen von autologem Darminhalt in ausgeschaltete ileale Schlingen ein rasches Wiederauftreten der Entzündung verursacht werden (D’Haens et al., 1998). Ähnliches ließ sich bei der Pouchitis beobachten, die ja durch eine Entzündung nach Einschaltung des Pouches in die normale Darmpassage mit Kontakt zu Faeces und Mikroflora charakterisiert ist (Ruseler-van-Emden et al., 1994). Der gemeinsame Nenner dieser rekurrenten Inflammationen ist eine Veränderung von Qualität und/oder Quantität sowie Diversität des bakteriellen und nutritiv bedingten Darminhaltes. Dies legt nahe, dass eine Imbalance in der intestinalen Mikroflora einen wichtigen Faktor in der Entstehung und Aufrechterhaltung der chronischen Inflammation bei CED darstellt (Ott et al., 2004). Auch im Tiermodell konnte diese These bestätigt werden: Es wurde nachgewiesen, dass die exzessive Zufuhr von intestinalen Bakterien zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen in der Mucosa und zu vermehrter Granulozyteninfiltration, letztlich also zu einer entzündlichen Reaktion führt, die durch Antibiotika oder eine Beschleunigung der Darmpassage gelindert werden kann (Komatsu et al., 1997).

1.4.4 Zusammenfassung Pathogenese

Zusammenfassend wird derzeit die Theorie postuliert, dass die intestinale Mikroflora eine durch Verlust der Immuntoleranz gegenüber der homologen Flora ungehemmte Immunreaktion initiiert. Die fehlende Fähigkeit zur physiologischen Abschwächung der initial ausgelösten Immunantwort führt zu einer chronifizierenden Entzündung in dem genetisch dazu veranlagten Wirt. Umweltfaktoren verhalten sich dabei nicht als Auslöser,

sondern als modifizierende Faktoren, die die Ausprägung der Erkrankung ausmachen (Sands E, 2007).

1.5 Immunologie

Im Folgenden sollen die immunologischen Grundlagen der CED dargelegt und die untersuchten Zytokine in ihrer Funktion und Eigenschaft vorgestellt werden.

1.5.1 Immunologische Abläufe im Gastrointestinaltrakt

Der Gastrointestinaltrakt stellt mit seiner Oberfläche eine Barriere zwischen 10^{13} eukaryoten Zellen des Wirtes gegenüber 10^{14} bakteriellen Zellen dar, wobei Letztere zwar im gesamten Gastrointestinaltrakt zu finden sind, aber in Verteilungsmuster und Konzentration deutlich variieren. Die Konzentration steigt von oral nach aboral kontinuierlich an, mit einem deutlichen Sprung jenseits der Ileozökalklappe und bis zu 10^{11} und 10^{12} Bakterien im Kolon (Tancrede C, 1992). Die Präsenz der wirtseigenen Darmflora ist entscheidend für die Reifung des Immunsystems, die Entwicklung einer normalen Darmmorphologie und in Bezug auf die Aufrechterhaltung einer chronischen und immunologisch ausbalancierten Entzündungsreaktion des Darmes (Simon et Gorbach, 1984). Es ist daher wichtig, die Abläufe innerhalb des intestinalen Immunsystems vor diesem Hintergrund zu betrachten, auch wenn die Interaktionen zwischen intestinaler Mikroflora und Immunsystem noch nicht vollständig geklärt sind.

Zu den ersten Abwehrmechanismen zwischen Mikroflora und Wirt gehört das Darmepithel. Zudem haben mechanische Faktoren wie Peristaltik und Desquamation eine Bedeutung sowie Faktoren, die mit der Bakterienadhäsion interagieren. Hierzu gehören die intestinale Schleimproduktion und sekretorisches Immunglobulin (IgA), das eine erste immunologische Barriere gegen Pathogene darstellt (Schreiber S., 1995). Zudem haben sich in einigen Studien Hinweise für eine Ausprägung des angeborenen Immunsystems in Form von antimikrobiellen Peptiden ergeben (Lohmuller et al., 1990). Durch die Bindung von bakteriellen Antigenen an zellständige Rezeptoren und die Ermöglichung einer sofortigen Reaktion kommt diesem System eine große Rolle zu. Vermittelnde Zellen sind hier Makrophagen, natürliche Killer (NK)-Zellen und Antigen präsentierende Zellen (APC). Über die zu den APC gehörenden dendritischen Zellen ist jedoch auch das adaptive Immunsystem an erster Front in den gastrointestinalen Immunprozess eingebunden (Bilsborough et Viney, 2004). Diese Zellen

befinden sich in einer relativ großen Population direkt unter den intestinalen Epithelzellen (Niess et Reinecker, 2005). Sie strecken lange Podozyten über die Interstitien der Epithelzellen bis in das Darmlumen vor, um dort luminal Antigen zu sammeln, diese zu prozessieren und den Zellen der Peyer'schen Plaques sowie mesenterialen Lymphknoten zu präsentieren. Dabei kann je nach Aktivierungsgrad und Antigennatur eine Immun- oder Toleranzreaktion folgen (Sands BE, 2007). Auch Enterozyten sind in der Lage Antigen zu präsentieren, wobei dies häufiger zu einer Toleranzreaktion führt (Savidge et al., 2006). Somit sind für die physiologische und auch die pathologische Immunreaktion des Gastrointestinaltraktes sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem von großer Bedeutung. Beide Systeme müssen daher sowohl einzeln als auch in ihrer Interaktion untereinander betrachtet werden.

Ein Weg, das Immunsystem in seinen komplexen Abläufen zu untersuchen, stellt die Gewinnung und Quantifizierung der durch immunkompetente Zellen produzierten und sezernierten Botenstoffe dar. Hierzu gehören die Interleukine, die großen Anteil an der Unterstützung oder Hemmung einer Immunreaktion haben. Im Falle der vorliegenden Studie wurden sowohl das anti-inflammatorisch wirkende Interleukin-10 (IL-10) als auch die pro-inflammatorischen Zytokine Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) untersucht. Sowohl IL-1 β als auch TNF- α sind potente Induktoren einer Entzündungsreaktion und werden nachweislich vermehrt in mononukleären Zellen sowohl in betroffenem als auch in nicht betroffenem Gewebe bei CED exprimiert (Schreiber et al., 1993 und 1995). Intestinale Makrophagen in der Lamina propria des Darmes stellen hierbei die Hauptproduzenten dar (Reinecker et al., 1993).

1.5.2 Das anti-inflammatorische Zytokin Interleukin-10

IL-10 ist ein wichtiger Regulator der Funktionen lymphoider und myeloischer Zellen. Es besitzt die Fähigkeit, die Zytokinsynthese anderer Zellen und etliche zusätzliche Funktionen von mononukleären Zellen zu hemmen. Diese Fähigkeiten machen IL-10 zu einem potenten Suppressor der Effektorfunktionen von Makrophagen, T-Zellen und NK-Zellen (natürliche Killerzellen). Zudem trägt IL-10 zur Regulation von Proliferation und Differenzierung von B-Zellen, Mastzellen und Thymozyten bei (Moore et al., 1993). IL-10 gehört zur Familie der Zytokine, die aus vier α -Helices bestehen (Shanafelt et al., 1991). Es handelt sich um ein 18 kDa schweres Polypeptid (Vieira et al., 1991), das eine schnelle Denaturierung durch Säure (pH < 5,5) erfährt, in basischer Umgebung (bis pH 11) jedoch stabil ist. Ein Genlocus

für IL-10 konnte auf dem Chromosom 1 identifiziert werden (Kim et al., 1992). Zu den IL-10-produzierenden Zellen gehören CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen, T_H0-, T_H1-, T_H2-Zellen (Yssel et al., 1992), Monozyten/Makrophagen, Keratinozyten, aktivierte B-Zellen, B-Lymphomzellen und mit EBV infizierte Burkitt-Lymphom-Zelllinien (Vieira et al., 1991; de Waal Malefyt et al., 1991; Salgame et al., 1991; Yamamura et al., 1991; Ralph et al., 1992; Benjamin et al., 1992). Im Verlauf einer Immunreaktion wird IL-10 relativ spät sezerniert (de Waal Malefyt et al., 1991), was einen wichtigen Aspekt bei der Inhibition von T-Zellen und in der Makrophagenaktivierung darstellen könnte (Moore et al., 1993).

Ein wichtiger Gesichtspunkt der IL-10-Wirkung ist die sog. CSIF (cytokine synthesis inhibitory factor)-Aktivität. Diese beschreibt die Hemmung der APC-abhängigen Zytokinsynthese sowohl von TH1- als auch von TH2-, TH0- und NK-Zellen, die in der Gegenwart von Antigen präsentierenden Zellen (APC) aktiviert werden. Diese Hemmung findet sowohl auf dem Level der Proteine als auch auf mRNA-Level statt (Vieira et al., 1991; Hsu et al., 1990).

Bei Anwesenheit von monozytären Zellen als APC führt IL-10 nicht nur zu einer Hemmung der Zytokinsynthese, sondern auch zur Proliferation von T-Zellen und T-Zellklonen (de Waal Malefyt et al., 1991; Taga et Tosato, 1992). Die Hemmung der APC-Funktion der monozytären Zellen durch IL-10 betrifft die meisten Aspekte der T-Zellaktivierung, inklusive Proliferation und Zytokinsynthese (de Waal Malefyt et al., 1991; Fiorentino et al., 1991; Ding et Shevach, 1992; Taga et Tosato, 1992), was hauptsächlich durch eine Reduktion der normalen und durch IFN- γ stimulierten Expression von MHC-Klasse-II-Antigenen durch Monozyten geschieht. Deshalb wird eher eine Prävention der T-Zellaktivierung als eine Suppression der T-Zellaktivierung durch IL-10 diskutiert (de Waal Malefyt et al., 1991).

IL-10 hat weiterhin direkte Effekte auf die mononukleären Zellen, zum Beispiel auf die Morphologie und den Phänotyp (Fiorentino et al., 1991). Zudem hemmt IL-10 die Synthese von IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF und G-CSF durch Monozyten nach Aktivierung durch LPS oder LPS und IFN- γ auf Protein- und mRNA-Ebene (de Waal Malefyt et al., 1991). Monozyten können in Folge der Aktivierung selbst IL-10 sezernieren, was dann ebenfalls die Synthese der eben genannten Zytokine im Sinne eines negativen Feedbacks hemmt. So kommt dem endogen produzierten IL-10 sowohl Autoregulationskapazität für die Monokinproduktion als auch die MHC-II-Expression durch LPS-aktivierte PBMNC zu (de Waal Malefyt et al., 1991; Fiorentino et al., 1991).

Durch die Hemmung unter anderem pro-inflammatorischer Zytokine und die gleichzeitige Anregung einer vermehrten Produktion von IL-1ra spielt IL-10 eine große anti-inflammatorische Rolle (Hannum et al., 1990).

Zudem konnte eine hemmende Wirkung auf die NO-Produktion durch Makrophagen nach IFN- γ -Stimulation festgestellt werden, wenn IL-10 innerhalb der ersten 12 h der IFN- γ -Aktivierung anwesend ist (Bogdan et al., 1991; Gazzinelli et al., 1992; Cunha et al., 1992).

Alle diese Funktionen belegen starke anti-inflammatorische Kapazitäten von IL-10, das deshalb auch als Makrophagen deaktivierender Faktor bezeichnet wurde.

1.5.3 Die pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-1 beta und Tumornekrosefaktor alpha

Interleukin-1 beta (IL-1 β)

IL-1 β ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das zur Interleukin-1 Familie gehört, die noch IL-1 α , IL-1ra (IL-1-Rezeptor-Antagonist) (Dinarello 1994, 1996, 1998, 2002) und neuere Familienmitglieder wie IL-18 (Okamura et al., 1995) beinhaltet. Als Genlocus ist der Zytokin-Gen-Cluster auf Chromosom 2, der die Gene IL1A, IL1B und IL1-RN umfasst, bekannt (Webb et al., 1986) und hier für IL-1 β insbesondere die Region q13 bis q21. IL-1 α und IL-1 β sind zu ca. 30 % strukturhomolog. Beide werden als 33 kDa schwere Vorläufermoleküle produziert (Giri et al., 1985), die durch intra- oder extrazelluläre Proteasen in ein 17 kDa schweres Molekül umgewandelt werden können. Während der Großteil von IL-1 α als Vorläufermolekül im Zytosol oder membranassoziiert an der Zelloberfläche verbleibt (Endres et al., 1989; Lonnemann et al., 1989), werden ca. 80 % des IL-1 β -Prekursors durch Einwirkung von Caspase-1 (interleukin-1-converting-enzyme; ICE) in das biologisch aktive IL-1 β umgewandelt (Ceretti et al., 1992), das aus zwölf bis 14 zu einem fassförmigen Molekül aufgebauten β -Strängen besteht. IL-1 β wird hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von anderen monozytären sowie dendritischen Zellen sezerniert. Es steigert die Expression von Adhäsionsmolekülen durch Endothelzellen, um die Transmigration von Leukozyten zu ermöglichen. Zudem hat es auch eine regulierende Funktion auf das Thermoregulationszentrum des Hypothalamus, was zu Fieber führt, und ist an der Regulation der Hämatopoese beteiligt.

Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)

TNF- α wurde zuerst 1975 in einer Arbeit von Carswell et al. als Verursacher der hämorrhagischen Nekrose von Tumoren beschrieben, woher der Name Tumornekrosefaktor rührt (Carswell et al., 1975). Es gehört zur TNF-Superfamilie, die 29 mit TNF verwandte Liganden und 29 Rezeptoren umfasst, die eine große Bandbreite an Funktionen jenseits der Zytotoxizität unter Einschluss von Entwicklung und Funktion des Immunsystems sowie Gewebshomöostase erfüllen (Tracey et al., 2008; Locksley et al., 2001; Dillon et al., 2006; Sabbagh et al., 2007). TNF- α ist ein zunächst als Typ II transmembranöses Protein mit intrazellulärem Aminoterminus produziertes Molekül, das durch proteolytische Spaltung durch Metalloproteasen (TNF- α -converting-enzyme; TACE) in das lösliche sTNF- α umgewandelt werden kann. Dieses besteht aus nicht kovalent gebundenen Trimeren von jeweils 17 kDa (Locksley et al., 2001; Hehlhans et Pfeffer, 2005). Sowohl die membrangebundene als auch die lösliche Form kann Signalketten induzieren. TNF- α wird von Makrophagen, Lymphozyten, Mastzellen und Endothelzellen, aber auch Herzmuskelzellen, Fibroblasten und neuronalem Gewebe produziert. Das Zytokin wird als Antwort auf Kontakt mit Lipopolysacchariden, Peptidoglykanen und bakterieller DNA sezerniert (Aderem et Ulevitch, 2000) und bindet an zwei Rezeptoren: TNFR1 und TNFR2. Ersterer wird auf fast allen Körperzellen exprimiert und von löslichem TNF aktiviert, Letzterer findet sich vorwiegend auf hämatopoetischen Zellen und bindet membranständiges TNF. Beide Rezeptoren werden zudem als lösliche Proteine ausgeschüttet und konkurrieren mit den membrangebundenen Rezeptoren um das freie TNF, was zu einer Hemmung der Bioaktivität führt. Die Bindung von TNF an die Rezeptoren führt zur Auslösung jeweils unterschiedlicher Signalketten in der Zelle, wobei die Rolle von TNFR2 noch nicht vollständig entschlüsselt ist, es im Gegensatz zu TNFR1 jedoch keine „Todesdomäne“ aufweist. Eine Aktivierung von TNFR1 kann zu zwei unterschiedlichen Reaktionen führen: Entzündungsreaktion und Überleben der Zelle oder Apoptose. Nach Bindung des Liganden werden verschiedene Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren aktiviert, unter anderem NF- κ B. Dieses induziert wiederum Apoptosehemmer, sodass das Überleben der Zelle gewährleistet ist. Ist die Aktivierung von NF- κ B in der Zelle nicht ausreichend, so kommt es als späte Reaktion auf die Bindung von TNF an TNFR1 zum programmierten Zelltod (Agarwal BB, 2003). Es gibt verschiedene Regulationsmechanismen wie negatives Feedback, regulierte Expression von Rezeptoren, Prozessierung von membrangebundenen Liganden und Rezeptoren in lösliche Form und Induktion von nicht an der Signalkette

beteiligten „decoy“ Rezeptoren (Locksley et al., 2001). Eine unregulierte Ausschüttung von TNF führt zu chronischen Entzündungsreaktionen, Kachexie und septischem Schock (Idriss et Naismith, 2000).

1.6 Fragestellung und Hypothesen

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Aufgaben bearbeitet werden:

1. Erstellen eines In-vitro-Modelle zur Testung der immunologischen Wirkung der Probiotika
2. Untersuchung einer möglichen Konzentrationskinetik der Wirkungsweise von Probiotikabestandteilen
3. Vergleich der Probiotika im In-vitro-Versuch, die bei CED therapeutischen Einsatz in Studien gefunden haben

Hierzu werden folgende Probiotikastämme eingesetzt:

- *Lactobacillus casei*
- *Lactobacillus plantarum*
- *Lactobacillus acidophilus*
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
- *Bifidobacterium longum*
- *Bifidobacterium breve*
- *Bifidobacterium infantis*
- *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* (L. GG)
- *Escherichia coli* Nissle (Mutaflor®)

2 Methoden

Es sollen nun der Aufbau der Studie sowie die untersuchten Proben und die Methoden dieser Untersuchung erläutert werden.

2.1 Aufbau der Studie

Aus Blutproben gesunder Blutspender wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMNC) extrahiert und jeweils mit einer einzelnen Spezies der Bakterien *L. casei*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, und *E. coli* Nissle inkubiert. Die Inkubation erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen der Bakterien, jeweils separat für Zelltrümmer und Zellüberstände nach Auftrennung der PBMNC, und zusätzlich mit und ohne Zugabe von LPS als stimulierendem Agens. Nach der Inkubation erfolgte die Bestimmung der Zytokine IL-10, IL-1 β und TNF- α für jeden dieser Ansätze.

2.2 Probenmaterial

Es wurden Blutproben von zwölf verschiedenen, gesunden Blutspendern entnommen, darunter sieben Frauen mit dem Durchschnittsalter von 44 Jahren und fünf Männer mit einem Durchschnittsalter von 52 Jahren.

2.3 Auftrennung der peripheren Blutmonozyten (PBMNC)

Nach Abtrennung der Erythrozytenphase durch die Transfusionsmedizin wurden die peripheren mononukleären Zellen (PBMNC) mithilfe der Dichtezentrifugationsmethode nach Boyum gewonnen (Boyum A, 1968). Das periphere Blut wurde dabei mit Hanks balanced salt solution (HBSS; ohne Ca²⁺ oder Mg²⁺; GIBCO, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt, unter Zusatz von 100 U/ml Heparin auf Ficoll (Lymphoprep, Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland) geschichtet und bei 400 g für 30 min ohne Bremse zentrifugiert. Im Anschluss wurde die PBMNC-Schicht (interface) gewonnen und die Zellen viermal in HBSS gewaschen. Hierzu wurden die Zellen jeweils in HBSS resuspendiert und erneut für 10 min bei 400 g zentrifugiert.

Nach dem letzten Waschschrift erfolgte die Resuspension der Zellen in RPMI 1640 (GIBCO, Karlsruhe, Deutschland) mit 10 % fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 µg/ml Gentamycin (alle Sigma, St. Louis, MO, USA). Die Lebensfähigkeit der gewonnenen Zellen wurde mit Trypanblau getestet und betrug über 97 %. Im Anschluss an das Zählen der Zellen pro Volumeneinheit wurde die Zellzahl auf 500.000 Zellen pro ml eingestellt.

2.4 Bakterien und Kulturbedingungen

Die in der Studie verwendeten Bakterien wurden vom Institut für Mikrobiologie, Bologna, Italien gezüchtet und für die Verwendung in der Kultur vorbereitet und bei –20 °C gelagert. Zusammengefasst wurde folgendermaßen vorgegangen:

Die in dieser Studie verwendeten Bakterienspezies und -stämme sind in Tabelle 1 aufgelistet. Es wurden Stämme aus dem pharmazeutischen probiotischen VSL#3 (Sigma Tau, Pomezia, Italien), *L. GG* sowie Mutaflor® (Ardeypharm Herdecke, Deutschland) verwendet. *Bifidobacterium*- und *Lactobacillus*-Spezies wurden in MRS-Nährlösung (Difco, Detroit, MI, USA) unter Zugabe von 0,05 % L-Cystein Hydrochlorid Monohydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) kultiviert. Alle Probiotikaspezies wurden unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C inkubiert, in der mittleren Wachstumsphase entnommen, gewaschen und in 5 ml RPMI 1640 Medium (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) resuspendiert. Diese Bakterienlösungen wurden anschließend mittels Ultraschall zerstört (Branson Sonifier W-250, Heinemann, Schwäbisch, Deutschland).

Die ultraschallbehandelte Lösung wurde erneut bei 8000 g für 30 min zentrifugiert, um die Zelltrümmer von den löslichen intrazellulären Bestandteilen zu trennen. Sedimentierte Zelltrümmer und Zellbestandteile im Überstand wurden nach der Trennung erneut in 5 ml frischem Kulturmedium gelöst, aliquotiert und bei einer Temperatur von –80 °C aufbewahrt.

Tabelle 1: Untersuchte Bakterienstämme

Bakterienstämme
Laktobakterien
<i>L. acidophilus</i> MB 443
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> MB 453
<i>L. plantarum</i> MB 452
<i>L. casei</i> MB 451
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> (<i>L. GG</i>)
Bifidobakterien
<i>B. breve</i> Y8
<i>B. longum</i> Y10
<i>B. infantis</i> Y1
<i>E. coli</i>
<i>E. coli</i> Nissle

2.5 Inkubation der Bakterien mit peripheren Blutmonozyten

Sowohl die Zelltrümmer als auch die Zellextrakte der Bakterien wurden in Konzentrationen von 1×10^2 bis 1×10^8 CFU (colony forming units)/ml zur Ko-Inkubation verwendet. Hierbei wurden 100 µl der spezifischen Konzentration in 900 µl Medium transferiert, das 500.000 PBMNC enthielt, und anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ für 36 h ko-inkubiert. Die Überstände wurden im Anschluss abgenommen und bei –20 °C bis zur weiteren Auswertung aufbewahrt. Es erfolgte die Überprüfung der Lebensfähigkeit der PBMNC mittels Trypanblau-Test. Auf jeder Inkubationsplatte wurde zusätzlich eine positive Kontrolle durch Zugabe von LPS zu den PBMNC sowie eine negative Kontrolle ohne Bakterien oder LPS untersucht.

2.6 Quantifizierung der Zytokine im Kulturüberstand

Die Quantifizierung der Zytokine im durch die zuvor genannten Schritte gewonnenen Kulturüberstand erfolgte durch ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay).

TNF- α : Anti-human TNF- α monoklonaler Fang-Antikörper (MAB 610, R&D Systems, Mineapolis, MN, USA) und biotinylierter Detektions-Antikörper (BAF 210 R&D Systems, Mineapolis, MN, USA) mit O-Phenylendiamin Puffer/H₂O₂ (Sigma, Steinheim, Deutschland) als Substrat. Eine Standardreihe wurde mittels rekombinantem humanen TNF- α erstellt (210-TA, R&D Systems, Mineapolis, MN, USA). Die Absorptionswerte der zu untersuchenden Proben wurden bei einer Wellenlänge von 490 nm auf einem handelsüblichen Interferenzphotometer jeweils in doppelter oder dreifacher Ausführung bestimmt.

IL-1 β : Anti-human IL-1 β monoklonaler Fang-Antikörper (MAB 601, R&D Systems, Mineapolis, MN, USA) und biotinylierter Detektions-Antikörper (BAF 201 R&D Systems, Mineapolis, MN, USA) mit O-Phenylendiamin Puffer/H₂O₂ (Sigma, Steinheim, Deutschland) als Substrat. Eine Standard-Testreihe wurde mittels rekombinantem humanen IL-1 β erstellt (201-LB, R&D Systems, Mineapolis, MN, USA). Die Absorptionswerte der zu untersuchenden Proben wurden bei einer Wellenlänge von 490 nm auf einem handelsüblichen Interferenzphotometer bestimmt. Die Messungen mittels ELISA erfolgten für eine Probe jeweils in doppelter oder dreifacher Ausführung.

IL-10: Anti-human monoklonaler IL-10 Fang-Antikörper (18551A Pharmingen, San Diego, CA, USA) und biotinylierter Detektions-Antikörper (18562D, Pharmingen, San Diego, CA, USA) mit O-Phenylendiamin Puffer/H₂O₂ (Sigma, Steinheim, Deutschland) als Substrat. Eine Standard-Testreihe wurde mittels rekombinantem humanen IL-10 erstellt (19701V, Pharmingen, San Diego, CA, USA). Die Absorptionswerte der zu untersuchenden Proben wurden bei einer Wellenlänge von 490 nm auf einem handelsüblichen Interferenzphotometer bestimmt. Die Messungen mittels ELISA erfolgten für eine Probe jeweils in doppelter oder dreifacher Ausführung.

2.7 Statistische Auswertung

Die Daten der Zytokinkonzentrationen werden in pg/ml als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) präsentiert. Zur Quantifizierung der Stimulationskapazität der Bakterien in verschiedenen Konzentrationen wird die Zytokinkonzentration als Fläche unter der Kurve (AUC) zusammengefasst und als AUC Mittelwert \pm SEM beschrieben. Die statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-Rank Test berechnet und als p-Wert ausgedrückt.

3 Ergebnisse

Bei der Auswertung der Ergebnisse interessieren folgende Fragestellungen:

1. In welchem Maße stimulieren die Zelltrümmer im Vergleich zu den Zellextrakten der verschiedenen Bakterien entsprechend ihrer Konzentration die Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β und des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10? (Abschnitt 3.1 bis 3.4)
2. Wie verhält sich die Stimulationskapazität der Zellextrakte und -trümmer der verschiedenen Bakterien zur Stimulationskapazität des LPS? (Abschnitt 3.5)
3. Welche Bakterien haben die stärkste pro- und welche die stärkste anti-inflammatorische Kapazität? (Abschnitt 3.5)

3.1 Stimulation mit LPS und ohne LPS/Probiotika

Die Ergebnisse, die aus der Zytokinproduktion der PBMNC nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) ohne Zugabe weiterer spezifischer Bakterienbestandteile resultierten, wurden gemittelt (144 Proben von 12 verschiedenen Spendern). Die durchschnittliche Zytokinfreisetzung von stimulierten PBMNC für IL-10 betrug $186,5 \pm 125,6$ pg/ml, für IL-1 β $1875,6 \pm 1381,2$ pg/ml und für TNF- α $356,0 \pm 249,1$ pg/ml. Die Zytokinproduktion nicht stimulierter PBMNC verblieb unter der Grenze des Messbaren im Rahmen des angewendeten ELISA.

3.2 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Zunächst sollen die Ergebnisse der Zytokinbestimmung mittels ELISA für die Zelltrümmer und Zellextrakte aller untersuchten Probiotika für IL-1 β erfolgen.

3.2.1 IL-1 β -Produktion der PBMNC nach Inkubation mit Zelltrümmern

Nach Inkubation der PBMNC mit Zelltrümmern der zu untersuchenden Bakterienstämme ließen sich mittels ELISA folgende Konzentrationen des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β messen (AUC, siehe Tabelle 2):

Tabelle 2: IL-1 β -Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Zelltrümmern

Bakterienstamm	Zytokinkonzentration im Überstand (pg/ml)
Laktobakterien	
<i>L. acidophilus</i> MB 443	1282,2 \pm 987,9
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> MB 453	4881,5 \pm 893,8
<i>L. plantarum</i> MB 452	3390,8 \pm 288,9
<i>L. casei</i> MB 451	988,7 \pm 273,3
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> (L.GG)	252,5 \pm 570,6
Bifidobakterien	
<i>B. breve</i> Y8	11152,9 \pm 2547,7
<i>B. longum</i> Y10	12364,0 \pm 192,5
<i>B. infantis</i> Y1	9018,8 \pm 2190,0
E. coli	
<i>E. coli</i> Nissle	9334,8 \pm 2486,1

Insgesamt lässt sich im Vergleich der Durchschnittswerte für die IL-1 β -Konzentration nach Stimulation durch Zelltrümmer probiotischer Bakterien Folgendes zusammenfassen: Die Laktobakterien zeigen erst ab einer Konzentration der Zelltrümmer von 10⁶ CFU/ml eine Stimulationskapazität, die dann jedoch rasch entsprechend der Konzentrationszunahme ansteigt. Für die Bifidobakterien ist insgesamt ein bereits bei niedrigen Konzentrationen beginnender rascher Anstieg der Stimulationskapazität zu erkennen, sie erreichen jedoch schon bei einer Zelltrümmerkonzentration von 10⁶ CFU/ml ihren Höchstwert, auf den ein deutlicher Abfall folgt. Für *E. coli* Nissle ist eine bei niedrigen Konzentrationen beginnende, kontinuierlich ansteigende Stimulationskapazität für die Sekretion von IL-1 β ersichtlich, deren maximale Werte deutlich über denen der Lakto- und Bifidobakterien liegen.

3.2.2 IL 1 β -Produktion der PBMNC nach Inkubation mit Zellextrakt

Nach Inkubation der PBMNC mit dem Zellextrakt der verschiedenen Bakterienspezies ließen sich folgende Werte (AUC, siehe Tabelle 3) für die Freisetzung von IL-1 β nachweisen:

Tabelle 3: IL-1 β -Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Zellextrakt

Bakterienstamm	Zytokinkonzentration im Überstand (pg/ml)
Laktobakterien	
<i>L. acidophilus</i> MB 443	15,5 \pm 28,9
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> MB 453	51,5 \pm 65,3
<i>L. plantarum</i> MB 452	36,3 \pm 18,9
<i>L. casei</i> MB 451	2794,7 \pm 848,3
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> (<i>L. GG</i>)	296,0 \pm 585,5
Bifidobakterien	
<i>B. breve</i> Y8	1488,3 \pm 454,0
<i>B. longum</i> Y10	491,0 \pm 190,6
<i>B. infantis</i> Y1	2142,3 \pm 925,0
E. coli	
<i>E. coli Nissle</i>	7875,0 \pm 1595,3

Eine deutliche Stimulation zur IL-1 β -Ausschüttung fand sich nach Stimulation mit Zellextrakten bei den Laktobakterien nicht. Die Bifidobakterien zeigten nur eine geringe Stimulation in Konzentrationen ab 10⁶ CFU/ml. Für *E. coli Nissle* konnte eine kontinuierlich mit der Konzentration ansteigende Stimulationskapazität bereits in niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden.

3.2.3 Zusammenfassung der IL-1 β -Produktion von PBMNC nach Inkubation

Die Ergebnisse der Ausschüttung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β durch PBMNC nach Stimulation mit Zelltrümmern und Zellextrakten der neun verschiedenen probiotischen Bakterienstämme lassen zunächst folgende Aussagen zu: Die größte Stimulationskapazität weist *E. coli Nissle* auf, der sowohl in fast gleichem Maße mit Zelltrümmern und Zellextrakten in fast linearer Konzentrationsabhängigkeit die IL-1 β -Sekretion stimuliert. Die Gruppe der Bifidobakterien zeigt eine ebenfalls gute Stimulationskapazität durch Zelltrümmer bereits in relativ niedrigen Konzentrationen mit einer ebenfalls fast linear verlaufenden Konzentrationsabhängigkeit bis zu Konzentrationen von 10^6 CFU/ml. In höheren Konzentrationen kommt es zu einem erneuten Abfall der Stimulationskapazität. Die Zellextrakte der Bifidobakterien weisen hingegen nur eine geringe Kapazität ab einer Konzentration von 10^7 CFU/ml auf. Die im Vergleich geringste Stimulationskapazität zur Ausschüttung von IL-1 β zeigen die Laktobakterien, wobei diese für die Zelltrümmer erst ab einer Konzentration von 10^7 CFU/ml und für die Zellextrakte überhaupt nicht zu detektieren ist (siehe Abbildung 1 und 2).

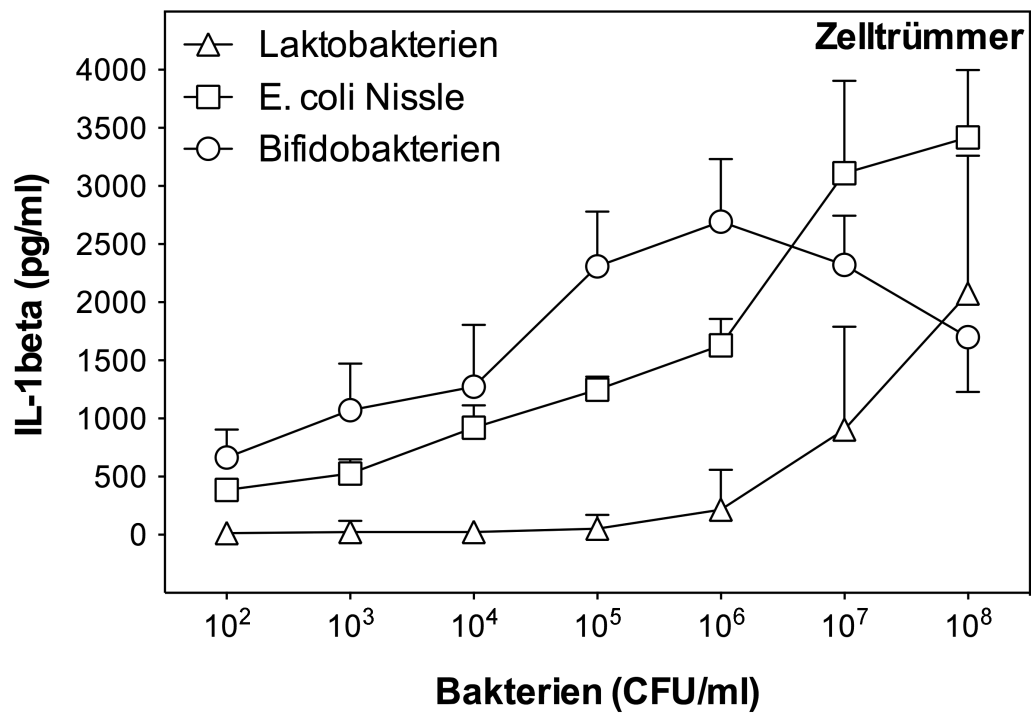


Abbildung 1: IL-1 β -Produktion nach Inkubation mit Zelltrümmern

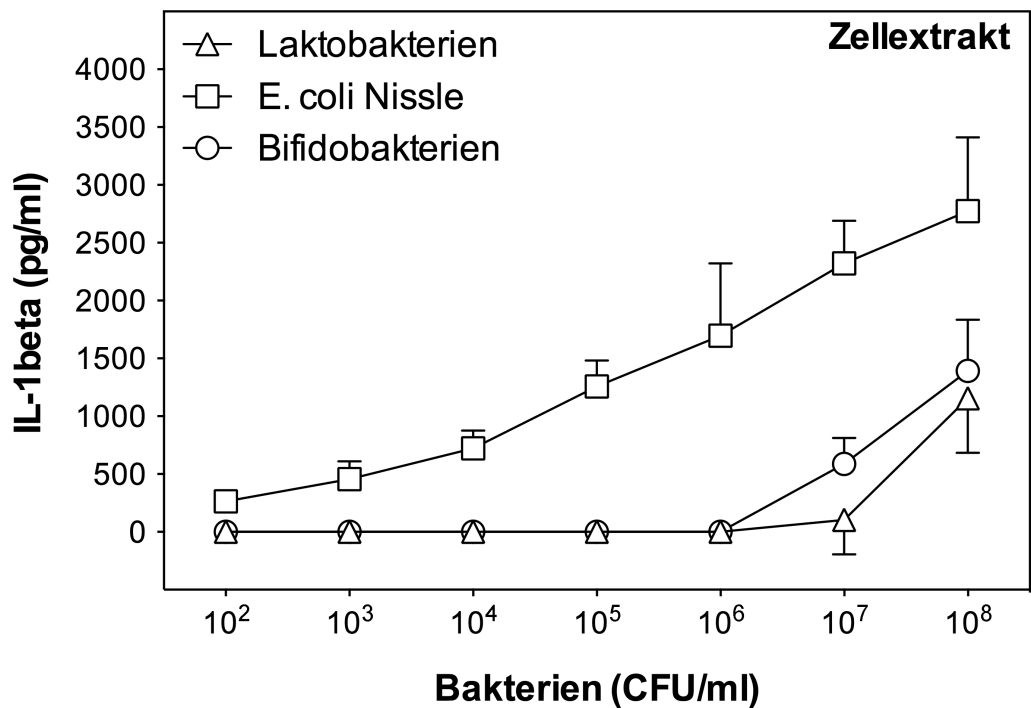


Abbildung 2: IL-1 β -Produktion nach Inkubation mit Zellextrakt

3.3 Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)

Es sollen nun die Ergebnisse der Zytokinbestimmung nach Stimulation mit Zelltrümmern und Zellextrakten für TNF- α dargestellt werden.

3.3.1 TNF- α -Produktion der PBMNC nach Inkubation mit Zelltrümmern

Nach Inkubation der PBMNC mit Zelltrümmern der verschiedenen Bakterienstämme ließen sich folgende Werte für die Ausschüttung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α messen (AUC, siehe Tabelle 4):

Tabelle 4: TNF- α -Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Zelltrümmern

Bakterienstamm	Zytokinkonzentration im Überstand (pg/ml)
Laktobakterien	
<i>L. acidophilus</i> MB 443	1695,3 \pm 879,3
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> MB 453	3593,2 \pm 822,1
<i>L. plantarum</i> MB 452	2466,5 \pm 433,3
<i>L. casei</i> MB 451	339,5 \pm 140,5
<i>L. casei</i> subsp. <i>ramnosus</i> (L.GG)	178,5 \pm 55,6
Bifidobakterien	
<i>B. breve</i> Y8	7645,5 \pm 1823,1
<i>B. longum</i> Y10	6951,1 \pm 522,7
<i>B. infantis</i> Y1	5584,8 \pm 1098,8
E. coli	
<i>E. coli</i> Nissle	1466,6 \pm 1356,0

Eine deutliche Stimulationskapazität für TNF- α nach Inkubation mit Zelltrümmern der probiotischen Bakterienstämme zeigte sich für Laktobakterien erneut erst ab relativ hohen Konzentrationen von 10^6 CFU/ml. Die Bifidobakterien wiesen eine insgesamt starke Stimulation auch schon in niedrigen Konzentrationen auf, jedoch einen Abfall der

Stimulationskapazität ab einer Konzentration von 10^6 CFU/ml. Für *E. coli Nissle* ließ sich in Konzentrationen bis 10^6 CFU/ml eine relativ niedrige, jedoch nicht konzentrationsabhängig ansteigende Stimulationskapazität erkennen, die insgesamt jedoch leicht höher lag als die der Laktobakterien. Ein deutlicher Anstieg findet sich erst ab der höchsten untersuchten Konzentration, diese erreicht dann aber weder die der Lakto- noch der Bifidobakterien

3.3.2 TNF- α -Produktion der PBMNC nach Inkubation mit Zellextrakt

Nach Stimulation der PBMNC durch die Zellextrakte der Probiotikastämme konnten folgende Werte für die Freisetzung von TNF- α mittels ELISA verifiziert werden (AUC, siehe Tabelle 5):

Tabelle 5: TNF- α -Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Zellextrakt

Bakterienstamm	Zytokinkonzentration im Überstand (pg/ml)
Laktobakterien	
<i>L. acidophilus</i> MB 443	$2,3 \pm 17,6$
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> MB 453	$13,3 \pm 13,4$
<i>L. plantarum</i> MB 452	$19,8 \pm 14,5$
<i>L. casei</i> MB 451	$303,9 \pm 117,2$
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> (<i>L. GG</i>)	$117,6 \pm 195,1$
Bifidobakterien	
<i>B. breve</i> Y8	$180,1 \pm 85,5$
<i>B. longum</i> Y10	$83,6 \pm 40,0$
<i>B. infantis</i> Y1	$290,5 \pm 103,6$
E. coli	
<i>E. coli Nissle</i>	$1153,0 \pm 748,4$

Unter den untersuchten Zellextrakten hatte lediglich der von *E. coli Nissle* einen überdurchschnittlichen, wenn auch niedrigen, Wert für die Zytokinfreisetzung. Eine konzentrationsabhängig ansteigende oder absteigende Stimulationskapazität konnte bei keinem der untersuchten Probiotika nachgewiesen werden.

3.3.3 Zusammenfassung der TNF- α -Produktion der PBMNC nach Inkubation

Bei der Zusammenschau der Ergebnisse für die Ausschüttung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α nach Stimulation durch Zelltrümmer und Zellextrakte der neun verschiedenen Bakterienstämme lassen sich folgende Aussagen machen: Insgesamt zeigen die Bifidobakterien für die Stimulation mit ihren Zelltrümmern die höchste Stimulationskapazität bereits in sehr niedrigen Konzentrationen, allerdings mit einem deutlichen Abfall ab einer Konzentration von 10^7 CFU/ml. Die Laktobakterien weisen eine zwar erst ab einer Konzentration von 10^6 CFU/ml ansteigende, dann aber dennoch im Verhältnis relativ gute Stimulationskapazität auf. Dabei bewirkt *E. coli Nissle* bereits in niedrigerer Konzentration eine Stimulation, die höher als die der Laktobakterien liegt, jedoch erst ab einer Konzentration von 10^7 CFU/ml ansteigt, dann aber unterhalb der Werte der anderen Probiotika verbleibt. Allerdings zeigt *E. coli Nissle* als einziges Probiotikum überhaupt eine Stimulationskapazität mittels Zellextrakt, die zudem der Stimulationskapazität mit Zelltrümmern in einem Konzentrationsbereich von 10^2 bis 10^7 CFU/ml entspricht. Die Zelltrümmer der Probiotika scheinen die Ausschüttung von TNF- α insgesamt stärker zu stimulieren als die Zellextrakte und die Bifidobakterien scheinen hier den größten Effekt zu erbringen (siehe Abbildung 3 und 4).

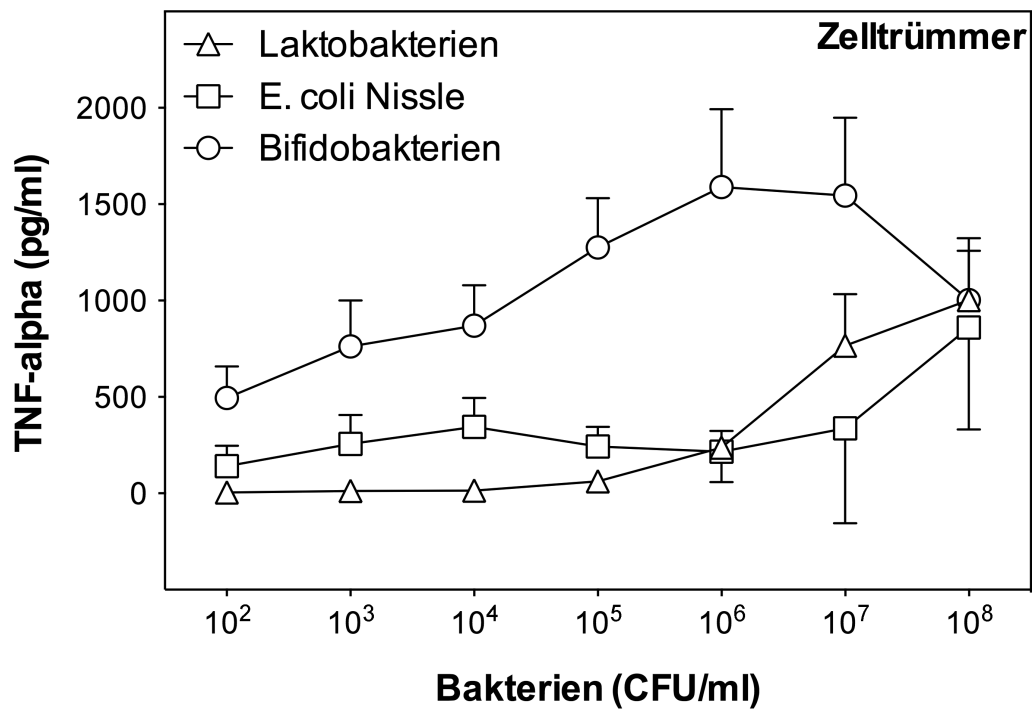


Abbildung 3: TNF- α -Produktion nach Inkubation mit Zelltrümmern

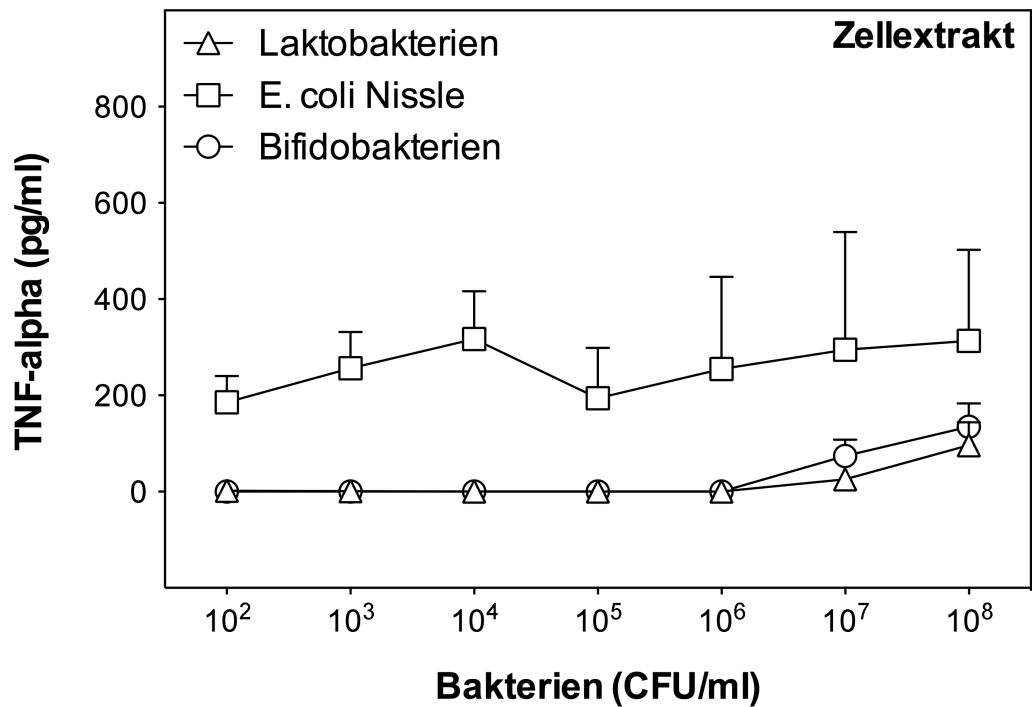


Abbildung 4: TNF- α -Produktion nach Inkubation mit Zellextrakt

3.4 Interleukin-10 (IL-10)

Zuletzt folgt nun die Darstellung der Ergebnisse aus den Bestimmungen des Zytokins IL-10 nach Stimulation mit Zelltrümmern und -extrakten der untersuchten Probiotika.

3.4.1 IL-10-Produktion der PBMNC nach Inkubation mit Zelltrümmern

Nach Stimulation der PBMNC mit Zelltrümmern der verschiedenen Bakterienstämme konnten mittels ELISA folgende Messwerte für die Ausschüttung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 erhoben werden (AUC, siehe Tabelle 6):

Tabelle 6: IL-10-Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Zelltrümmern

Bakterienstamm	Zytokinkonzentration im Überstand (pg/ml)
Laktobakterien	
<i>L. acidophilus</i> MB 443	131,8 ± 25,4
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> MB 453	572,0 ± 129,9
<i>L. plantarum</i> MB 452	9,9 ± 13,8
<i>L. casei</i> MB 451	209,0 ± 24,6
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> (<i>L. GG</i>)	61,0 ± 4,7
Bifidobakterien	
<i>B. breve</i> Y8	1062,7 ± 889,9
<i>B. longum</i> Y10	682,7 ± 466,9
<i>B. infantis</i> Y1	1095,6 ± 925,3
E. coli	
<i>E. coli Nissle</i>	1270,7 ± 210,9

Die stärkste Stimulation zur Ausschüttung von IL-10 zeigten die Zelltrümmer von *E. coli Nissle*, gefolgt von den Bifidobakterien. Trotz der insgesamt niedrigeren Kapazität der Bifidobakterien zeigten diese eine mit *E. coli Nissle* vergleichbare konzentrationsabhängige Steigerung und erreichten bei einer Konzentration von 10⁷ CFU/ml ähnliche Höchstwerte. Ab

dieser Konzentration lässt sich ein stark ausgeprägter Abfall der gemessenen IL-10-Werte erkennen, der für Bifidobakterien und *E. coli Nissle* gleichförmig erfolgt. Die Laktobakterien zeigten wie bereits zuvor erst ab höheren Konzentrationen der Zelltrümmer von 10^7 CFU/ml eine Stimulationskapazität.

3.4.2 IL-10-Produktion der PBMNC nach Inkubation mit Zellextrakt

Die Stimulation der PBMNC durch die Zellextrakte der einzelnen Bakterienstämme erbrachte folgende Ergebnisse für die mittels ELISA gemessene Ausschüttung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (AUC, siehe Tabelle 7):

Tabelle 7: IL-10-Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Zellextrakt

Bakterienstamm	Zytokinkonzentration im Überstand (pg/ml)
Laktobakterien	
<i>L. acidophilus</i> MB 443	$1,0 \pm 1,5$
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> MB 453	$3,8 \pm 4,65$
<i>L. plantarum</i> MB 452	$9,9 \pm 13,8$
<i>L. casei</i> MB 451	$300,9 \pm 109,8$
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> (<i>L. GG</i>)	$17,1 \pm 26,0$
Bifidobakterien	
<i>B. breve</i> Y8	$182,6 \pm 177,5$
<i>B. longum</i> Y10	$30,5 \pm 28,9$
<i>B. infantis</i> Y1	$228,3 \pm 233,0$
E. coli	
<i>E. coli Nissle</i>	$1154,8 \pm 264,0$

Nach Stimulation der PBMNC durch die Zellextrakte der Bakterienstämme zeigte sich lediglich durch *E. coli Nissle* eine mit ansteigender Konzentration zunehmende Stimulationskapazität mit einem deutlichen Abfall für Konzentrationen über 10^7 CFU/ml. Sowohl Lakto- als auch Bifidobakterien wiesen nur eine minimale Stimulationskapazität ab einer Zellextraktkonzentration von 10^7 CFU/ml auf, wobei der Effekt der Bifidobakterien etwas stärker war.

3.4.3 Zusammenfassung der IL-10-Produktion durch PBMNC nach Inkubation

In der Zusammenschau der Ergebnisse für die Stimulation der IL-10-Sekretion der PBMNC lassen sich folgende Feststellungen machen: *E. coli Nissle* zeigt als einziges Probiotikum eine Stimulationskapazität durch Zelltrümmer und Zellextrakt, die zudem bereits in niedrigen Konzentrationen zu finden ist und mit zunehmender Konzentration deutlich ansteigend. Sowohl bei Stimulation mit Zelltrümmern als auch -extrakten findet sich ein deutlicher und gravierender Abfall der gemessenen sezernierten IL-10-Menge bei Konzentrationen über 10^7 CFU/ml. Dieser gleiche Effekt tritt auch bei den Bifidobakterien auf, die zumindest mittels Zelltrümmern eine etwas schwächere, aber dennoch deutliche und konzentrationsabhängig ansteigende Stimulationskapazität aufweisen. Die Laktobakterien zeigen für die Zelltrümmer erst ab einer Konzentration von 10^6 CFU/ml eine Stimulationskapazität, dann jedoch einen starken Anstieg mit einem Höchstwert bei einer Zelltrümmerkonzentration von 10^8 CFU/ml, die fast dem bei 10^7 CFU/ml erhaltenen Höchstwert von *E. coli Nissle* und Bifidobakterien entspricht. Die minimale Stimulationskapazität von Bifido- und Laktobakterien mittels Zellextrakten zeigt sich ebenfalls nur in den beiden höchsten Konzentrationen. Als potentester Stimulator einer IL-10 Sekretion stellt sich somit *E. coli Nissle* dar, gefolgt von den Bifidobakterien, die eine ähnliche Konzentrationsabhängigkeit zeigen. Die schwächste Kapazität lässt sich insgesamt für die Laktobakterien erkennen, mit einer allerdings differenten Verlaufsform der Konzentrationsabhängigkeit (siehe Abbildung 5 und 6).

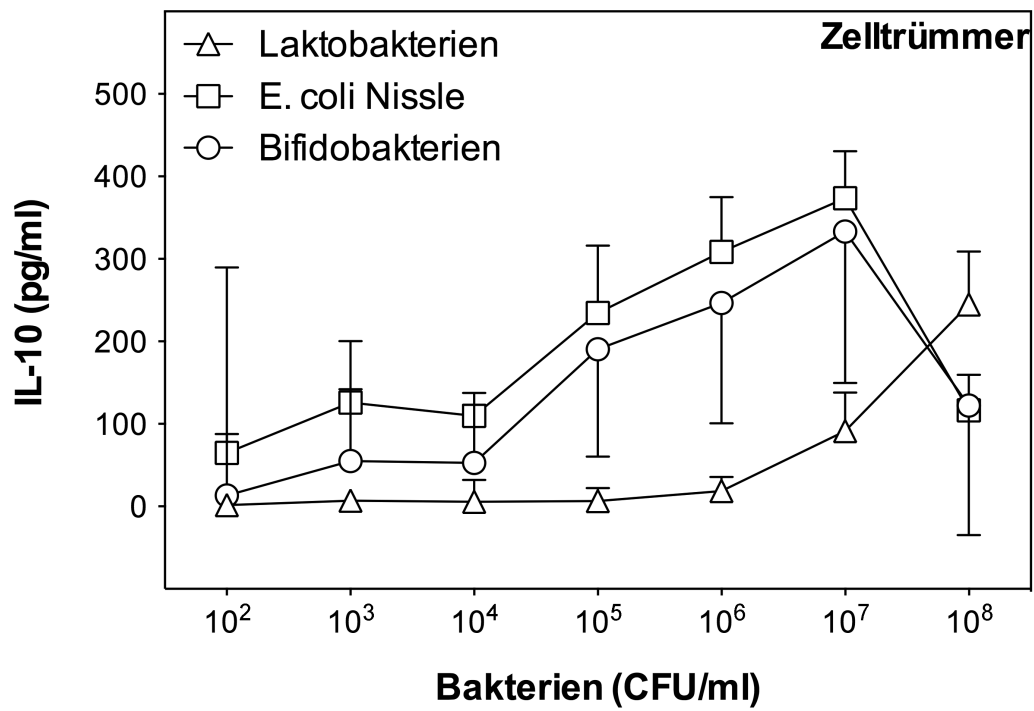


Abbildung 5: IL-10-Produktion nach Inkubation mit Zelltrümmern

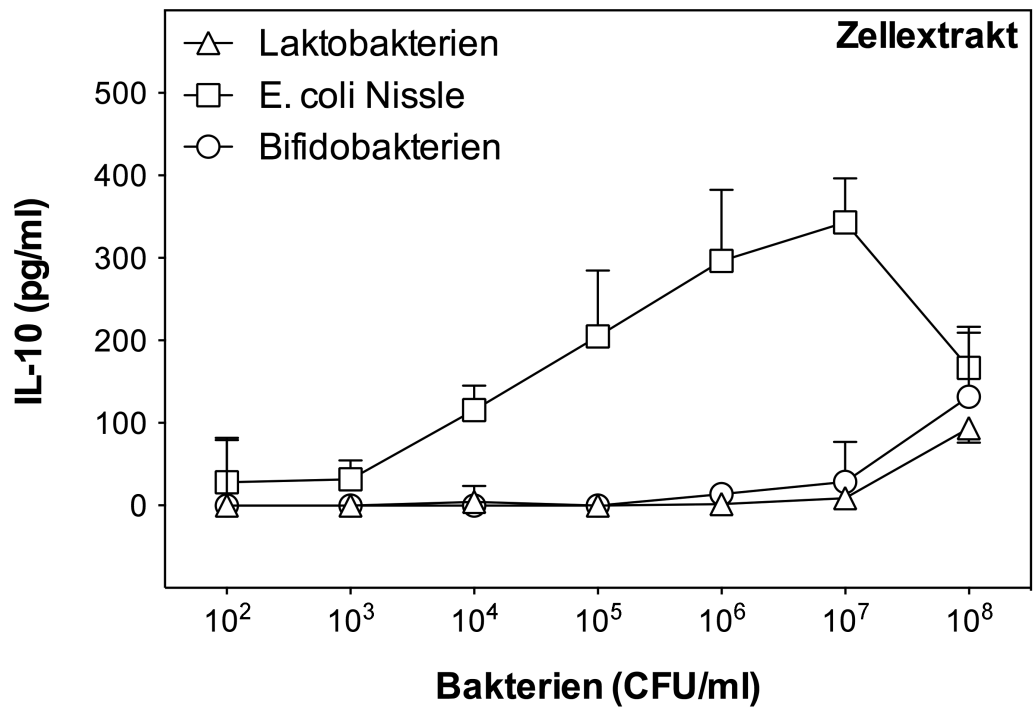


Abbildung 6: IL-10-Produktion nach Inkubation mit Zellextrakt

3.5 Vergleich der Stimulation mit LPS vs. Probiotika

Da die Inkubation der PBMNC ohne jegliche Zusätze keine messbare Zytokinsekretion erbrachte, eine Ko-Inkubation der Zellen mit dem typischen bakteriellen Antigen LPS jedoch durchweg ähnliche Werte ergab, wurden diese als Basis für einen Vergleich zwischen reiner LPS-Stimulation und der relativen Stimulation durch die Probiotika herangezogen. Ziel war es, die Stimulationskapazität der Probiotikafamilien insbesondere in Hinblick auf die anti- oder pro-inflammatorische Tendenz genauer zu untersuchen und übersichtlich darzustellen.

In der vorliegenden Studie wurden zwei unterschiedliche pro-inflammatorisch wirkende Zytokine mit verschiedenen Eigenschaften sowie Sekretionskinetiken untersucht. Deshalb erfolgte ein Vergleich zwischen jeweils der Sekretionskapazität für IL-10 und IL-1 β sowie IL-10 und TNF- α , um einen Index für die von den Probiotika erwartete relative anti-inflammatorische Kapazität gegenüber der bakteriellen LPS-Stimulation zu erhalten. Es wurden zunächst die Werte für die Zytokinproduktion der einzelnen Probiotika (gemittelte Werte aus den jeweils vier- bis sechsfachen Wiederholungen mit einem Probiotikum) in Relation zu denen nach Stimulation mit LPS gesetzt. Hierzu wurden nur die Werte der Stimulation in der Konzentration 10^7 CFU/ml verwendet, da in dieser Konzentration bei allen Probiotika in der Regel die größte Stimulationskapazität nachzuweisen war. Diese Berechnungen erfolgten jeweils für jede Probiotikumfamilie und jedes der drei untersuchten Zytokine. Im Anschluss wurden die so erhaltenen Relationswerte zwischen Probiotika- und LPS-induzierter Zytokinproduktion für die Berechnung eines Indexwertes für die anti-inflammatorische Kapazität der Probiotika gegenüber LPS verwendet. Hierzu wurden jeweils die Relationswerte zwischen IL-10/LPS durch diejenigen von TNF- α bzw. IL-1 β dividiert. Da die beiden pro-inflammatorischen Zytokine unterschiedliche Wirkungen während einer Entzündungsreaktion auslösen, wurden sie nicht zu einer pro-inflammatorischen Einheit zusammengefasst, sondern einzeln im Vergleich zu IL-10 betrachtet. Die Berechnungen erfolgten jeweils für Zelltrümmer und Zellextrakt einzeln sowie für alle Probiotika getrennt (siehe Abbildung 7 und 8) als auch für die Probiotikafamilien (siehe Abbildung 9 und 10).

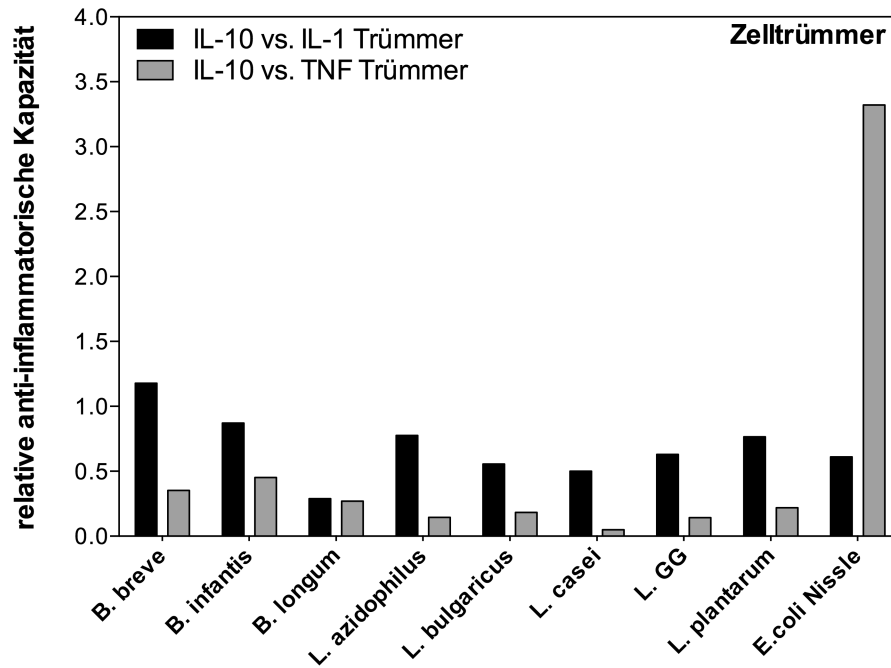


Abbildung 7: Relative anti-inflammatorische Kapazität der einzelnen Probiotika. Dargestellt ist die relative anti- vs. pro-inflammatorische Stimulationskapazität aller untersuchten Probiotika für die Stimulation der PBMNC mit Zelltrümmern in einer Konzentration von 10^7 CFU/ml für TNF- α und IL-1 β getrennt.

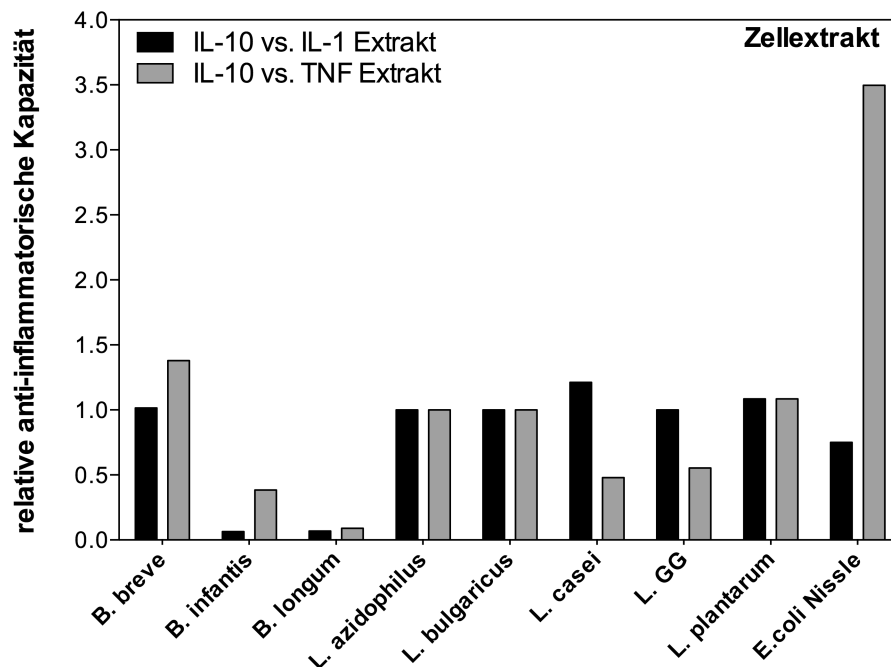


Abbildung 8: Relative anti-inflammatorische Kapazität der einzelnen Probiotika. Dargestellt ist die relative anti- vs. pro-inflammatorische Stimulationskapazität aller untersuchten Probiotika für die Stimulation der PBMNC mit Zellextrakten in einer Konzentration von 10^7 CFU/ml für TNF- α und IL-1 β getrennt.

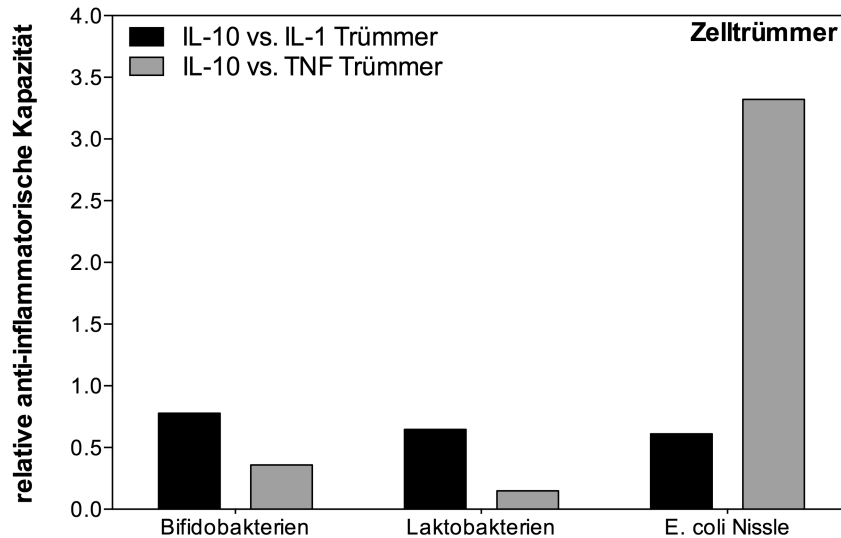


Abbildung 9: Relative anti-inflammatorische Kapazität der einzelnen Probiotika. Dargestellt ist die relative anti- vs. pro-inflammatorische Stimulationskapazität aller untersuchten Probiotika zusammengefasst in Familien für die Stimulation der PBMNC mit Zelltrümmern in einer Konzentration von 10^7 CFU/ml für TNF- α und IL-1 β getrennt.

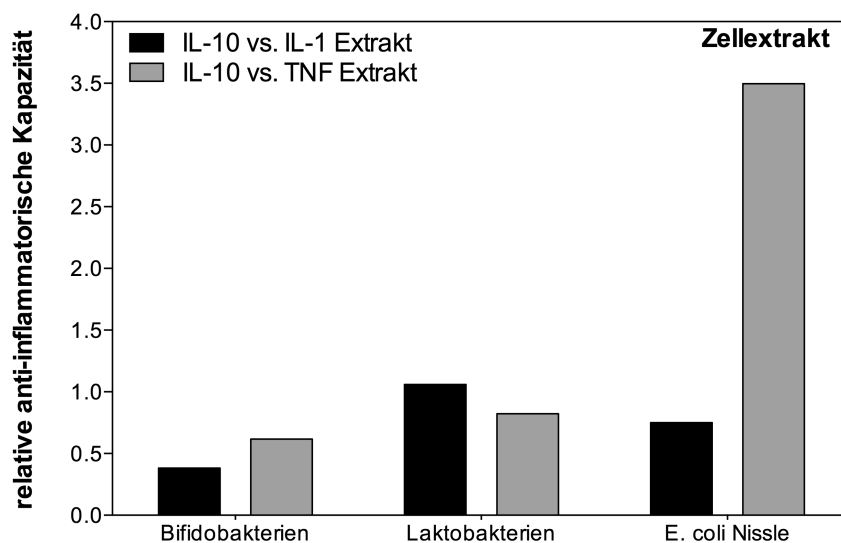


Abbildung 10: Relative anti-inflammatorische Kapazität der einzelnen Probiotika. Dargestellt ist die relative anti- vs. pro-inflammatorische Stimulationskapazität aller untersuchten Probiotika zusammengefasst in Familien für die Stimulation der PBMNC mit Zellextrakten in einer Konzentration von 10^7 CFU/ml für TNF- α und IL-1 β getrennt.

E. coli Nissle zeigte hierbei eine ausgesprochen starke relative anti-inflammatorische Kapazität für IL-10 im Vergleich zu TNF- α , die ungefähr 3,3-mal so stark war wie die von LPS allein. Gegenüber IL-1 β ließ sich eine deutlich geringere anti-inflammatorische Kapazität erkennen, die sich mit Werten um das 0,5-Fache in etwa auf dem Niveau der übrigen Probiotika bewegt.

4 Diskussion

Im Folgenden sollen nun die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse insbesondere bezüglich ihrer Bedeutung für die Mechanismen der Pathogenese der CED und die klinische Relevanz in der Therapie diskutiert werden.

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Für die Untersuchung der Stimulationskapazität für IL-10 von Zelltrümmern und -extrakten der verschiedenen Bakterienstämme und -spezies lassen sich folgende zusammenfassende Aussagen machen: Die höchste Stimulationskapazität für die Ausschüttung von IL-10 weist *E. coli Nissle* auf und dies gleichermaßen für Zelltrümmer als auch Zellextrakte mit einer Zunahme der insgesamt sehr guten Stimulationskapazität mit steigender Konzentration bis zu 10^7 CFU/ml. Auch die drei untersuchten Stämme der Bifidobakterien haben einen guten Stimulationseffekt auf die PBMNC, allerdings nur für die Zelltrümmer und hier in einem deutlich engeren Konzentrationsfenster von 10^4 bis 10^7 CFU/ml. Sowohl bei der Stimulation durch Zelltrümmer und -extrakte von *E. coli Nissle* als auch durch die Zelltrümmer der Bifidobakterien kommt es in der höchsten angewandten Probiotikakonzentration von 10^8 CFU/ml jedoch zu einem deutlichen Konzentrationsabfall der gemessenen IL-10-Sekretion. Die untersuchten Laktobakterien zeigen die geringste Stimulationskapazität, wobei sich nur durch die Zelltrümmer ab einer Probiotikakonzentration von 10^5 CFU/ml eine mit der Konzentration zunehmende Sekretion von IL-10 messen lässt. Innerhalb der Gruppe der Laktobakterien nimmt das nicht aus dem pharmazeutischen VSL#3 stammende *L. GG* eine mittlere Position mit ebenfalls stärkerer Stimulation durch Zelltrümmer und geringerer durch die Zellextrakte ein. Als Schlussfolgerung scheint *E. coli Nissle* als anti-inflammatorisches Zytokin den größten Effekt bei der Stimulation der Freisetzung von IL-10 zu haben. Daneben zeigen jedoch auch die Bifidobakterien zumindest für die Zelltrümmer gute Stimulationskapazitäten, die jedoch wie bei *E. coli Nissle* nur in Konzentrationen bis 10^7 CFU/ml nachweisbar sind.

Für die Stimulationskapazität von IL-1 β durch die einzelnen Probiotika lassen sich folgende zusammenfassenden Aussagen machen: Die höchste Stimulationskapazität weist auch hier *E. coli Nissle* sowohl für Zelltrümmer als auch -extrakte in einer einfachen Dosis-Wirkungsbeziehung auf, ohne dass es zu einem Sekretionsabfall in der höchsten

Probiotikakonzentration kommt. Die Bifidobakterien zeigen für die Zelltrümmer ebenfalls eine gute und mit ansteigender Konzentration zunehmende Stimulationskapazität, allerdings kommt es wie bei der Stimulation von IL-10 zu einem Sekretionsabfall ab einer Konzentration von 10^6 CFU/ml. Die Zellextrakte der Bifidobakterien zeigen nur eine geringe Stimulationskapazität in den höchsten Konzentrationen. Für die Laktobakterien konnte eine mit der Konzentration zunehmende Kapazität ab 10^6 CFU/ml durch die Zelltrümmer, jedoch keine signifikante Stimulation durch die Extrakte ermittelt werden. *L. GG* weist im Vergleich zu den übrigen Laktobakterien die geringste Stimulationskapazität mittels Zelltrümmern und eine mittlere mittels Zellextrakten auf. Insgesamt zeigt *E. coli Nissle* somit auch für die Stimulation von IL-1 β die größte Kapazität, allerdings mit einer anderen Kinetik als bei der IL-10-Stimulation. Die Bifidobakterien zeigen eine gute, jedoch etwas geringere Kapazität bei der Zelltrümmerstimulation, wobei die Kinetik der IL-10-Stimulation ähnelt. Zellextrakte der Bifidobakterien sowie Trümmer und Extrakte der Laktobakterien zeigen nur einen geringen Effekt.

Bei Untersuchung der Stimulationskapazität für TNF- α ergab sich für *E. coli Nissle* eine relativ geringe Kapazität, die lediglich durch Zelltrümmer ab einer Konzentration von 10^7 CFU/ml einen zunehmenden Anstieg zeigte. Die Bifidobakterien ließen die weitaus stärkste Kapazität für die Zelltrümmer erkennen, mit einem konzentrationsabhängigen Anstieg bis zu einem Maximum bei 10^6 und 10^7 CFU/ml und einem Abfall in der höchsten Konzentration. Die Laktobakterien wiesen für die Zelltrümmer einen deutlichen Anstieg der Stimulationskapazität ab einer Konzentration von 10^5 CFU/ml auf. Somit zeigten sich für die Stimulation der Ausschüttung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α die Bifidobakterien gefolgt von den Laktobakterien mittels Zelltrümmern am effektivsten. Die Extrakte aller drei untersuchten Probiotikagruppen erbrachten in allen Konzentrationen kaum eine Stimulation. *L. GG* zeigte eine Stimulationskapazität für TNF- α , die der von IL-1 β ähnelt, mit der geringsten Kapazität durch Zelltrümmer und einer mittleren für Extrakte im Vergleich zu den anderen Laktobakterien.

Bei Betrachtung der relativen anti-inflammatorischen Kapazität der untersuchten Probiotikagruppen im Verhältnis zur basalen, durch LPS-Stimulation erzeugten Zytokinausschüttung (beispielhaft für die Konzentration mit der in der Regel höchsten Zytokinausschüttung von 10^7 CFU/ml), zeigt *E. coli Nissle* die größte anti-inflammatorische Kapazität (für TNF- α das ca. 3,3-Fache der basalen Stimulation durch LPS, für IL-1 β das ca.

0,5-Fache). Die relative anti-inflammatorische Kapazität der Bifidobakterien und Laktobakterien ist deutlich geringer ausgeprägt, zeigte sich jedoch im Vergleich zu IL-1 β stärker als im Vergleich zu TNF- α . Dabei scheinen bei den Zelltrümmern die Bifidobakterien und bei den Zellextrakten die Laktobakterien einen größeren Effekt zu haben.

4.2 Einordnung in die Literatur

Eine Untersuchung der Stimulationskapazität einzelner probiotischer Bakterien in Hinblick auf die Ausschüttung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine immunkompetenter Zellen wurde in dieser systematischen Form bis zum Zeitpunkt der hier vorgestellten Studie bzw. zum heutigen Datum nicht durchgeführt. Es finden sich Untersuchungen zu einzelnen probiotischen Keimen und verschiedenen Zytokinen (Schultz et al., 2002; Miettinen et al., 1996 und 1998), Vergleiche zwischen deren verschiedenen immunologischen Eigenschaften insbesondere in Bezug auf klinische Effekte wurden jedoch nicht angestellt. Daten klinischer Studien mit Anwendung probiotischer Bakterien im Rahmen der Erhaltungstherapie bei CED liegen vor (Gionchetti et al., 2000, Rembacken et al., 1999, Kruis et al., 1997, Prantera et al., 2002). Die Ergebnisse spiegeln als Endpunkte den klinischen Erfolg zum Beispiel gemessen an klinischen Aktivitätsindizes wider, erlauben aber keine Aussage über den Mechanismus der positiven Effekte der einzelnen verwendeten Probiotika. Jedoch lassen sich einige der Ergebnisse mit vorangegangenen klinischen Studien in Relation setzen. So zeigte *E. coli Nissle* in der vorliegenden Arbeit die weitaus größte Stimulationskapazität für die Sekretion von anti-inflammatorisch wirksamem IL-10, eine ebenfalls starke IL-1 β -Stimulation, jedoch eine im Verhältnis eher geringere TNF- α -Stimulation. *E. coli Nissle* (Mutaflor®) ist der probiotische Stamm, dessen klinische Wirkung in der Remissionserhaltung am besten dargelegt ist und der in Deutschland als einziges Probiotikum überhaupt eine Zulassung hat (bei der Colitis ulcerosa mit Mesalazin-Unverträglichkeit). Die hier dargelegte gute, wenn auch nicht ganz so starke, IL-10-Stimulationskapazität der Bifidobakterien im Vergleich zu *E. coli Nissle* könnte in Bezug zu einer guten Präventionskapazität für CED in klinischen Studien mit Bifidobakterien stehen. So findet sich zum Beispiel eine hohe Konzentration von Bifidobakterien in der therapeutisch erfolgreich angewendeten Präparation VSL#3. *L. GG* als ein häufig eingesetztes Probiotikum zeigt in der In-vitro-Untersuchung keine sonderliche Stimulationskapazität und auch in klinischen Studien unterschiedliche Erfolge in der Therapie der CED mit sowohl positiven (Malin et al., 1996), jedoch überwiegend negativen Ergebnissen im Sinne einer Wirkungslosigkeit (Prantera et al., 2002; Schultz et al., 2004).

Es konnte in mehreren Arbeiten eine Veränderung der Levels verschiedener Zytokine und hier insbesondere eine Erhöhung des IL-10-Levels im Gewebe von CED-Patienten nach Applikation von Probiotika nachgewiesen werden (Ulisse et al., 2001). Dies lässt auf eine Anregung der immunkompetenten Zellen des Gastrointestinaltraktes zur Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine durch Probiotika schließen. Mit diesen Ergebnissen, die die allgemeine Fähigkeit probiotischer Bakterien zur Zytokinstimulation in monozytären Zellen des Immunsystems darlegen, kann somit ein grundlegender Gedanke im Verständnis der Wirkweise von Probiotika bestätigt werden.

Des Weiteren liegen bis jetzt keine detaillierten Daten über eine mögliche Dosis-Wirkungs-Beziehung in der Anwendung probiotischer Therapeutika vor. Aufgrund der guten klinischen Wirksamkeit des in äußerst hoher Dosis angewendeten VSL#3 von drei Milliarden Bakterien pro Gramm und einer Einnahme von sechs Gramm pro Tag wurde die Hypothese eines dosisabhängigen Effektes postuliert (Gionchetti et al., 2000). In den hier dargelegten Ergebnissen lässt sich tatsächlich für einzelne Bakterienstämme eine Dosisabhängigkeit nachweisen, die sich jedoch je nach Spezies oder Stamm deutlich unterscheidet.

4.3 Interpretation der Ergebnisse

Mit der vorliegenden Studie konnte die grundlegende Hypothese bestätigt werden, dass probiotische Bakterien die Fähigkeit besitzen, eine immunkompetente Zelle zur Sekretion von sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Zytokinen anzuregen. Dies stellt eine wichtige Grundlage für die weitere Aufklärung der Wirkmechanismen dar. Probiotische Bakterien sind demnach in der Lage, eine Immunreaktion für den Wirt durch Modulation der Signalwege durch Zytokine zu beeinflussen. Diese Wirkung von Probiotika kann jedoch nicht verallgemeinert werden, sondern muss für die einzelnen Stämme separat betrachtet und untersucht werden. Dies lässt sich anhand der vorliegenden Daten nachvollziehen, nach denen die Stimulationskapazität familien- und speziesspezifisch ist.

Anhand von klinisch nach Probiotika-Anwendung nachgewiesenen deutlich erhöhten Gewebespiegeln des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10, nicht ansteigender Spiegel von IL-1 β und TNF- α (Ulisse et al., 2001) und der hier aufgezeigten guten Stimulationsfähigkeit von *E. coli Nissle* und Bifidobakterien für IL-10 bei deutlich geringerer Stimulationsfähigkeit für die pro-inflammatorischen Zytokine lässt sich Folgendes vermuten: Probiotika verschieben durch jeweilige Aktivierung oder Hemmung die Immunreaktion zugunsten der

anti-inflammatorischen Seite. Auf welchem Wege dies geschieht, ist nach wie vor nicht aufgeklärt. In grundlegenden Arbeiten zur immunregulatorischen Rolle von IL-10 konnte jedoch nachgewiesen werden, dass IL-10 sowohl auf Protein- als auch auf transkriptionaler Ebene zu einer Hemmung der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1 β bzw. deren mRNA führt (Hannum et al., 1990). Gleichzeitig wird die Produktion des IL-1ra (IL-1-Rezeptor-Antagonist) gefördert und das Verhältnis zwischen pro- und anti-inflammatorischen Faktoren zugunsten des positiven Effektes verschoben. Sowohl die Sekretion von IL-10 als auch die Effekte auf die beeinflussten Zytokine inklusive der Autoregulation der IL-10-Produktion im Sinne eines negativen Feedbacks folgen einer spezifischen zeitlichen Kinetik (Schreiber et al., 1995). Dies wurde in der präsentierten Studie noch nicht berücksichtigt, könnte aber essenziell für das Verständnis der Abläufe sein.

Es ist zu vermuten, dass Probiotika somit über einen noch nicht ganz aufgeklärten Mechanismus sowohl die Produktion von IL-10 als auch die von TNF- α und IL-1 β induzieren. Durch die regulatorischen Fähigkeiten von IL-10 kommt es jedoch zu einer nachfolgenden Hemmung der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine. In Gewebe von nicht mit Probiotika behandelten CED-Patienten lässt sich sowohl in betroffenen als auch in nicht betroffenen Bereichen wie bei Gesunden zu keiner Zeit ein erhöhter IL-10-Spiegel nachweisen. Nach einer Probiotikabehandlung findet sich dieser jedoch sehr wohl (Ulisse et al., 2001), weshalb die übermäßige IL-10-Stimulation mit nachfolgender starker TNF- α - und IL-1 β -Suppression als wichtiger Effekt der Probiotikawirkung postuliert werden kann. Da der Gewebegehalt an IL-10 sich zwischen CED-Patienten und Gesunden ohne Probiotikatherapie nicht unterscheidet, stellt sich die Frage, ob eine möglicherweise bei CED veränderte Halbwertszeit, ein schnellerer Verbrauch oder ein relatives Defizit durch Veränderungen der Umgebung von IL-10 durch die übermäßige Stimulation durch Probiotika aufgefangen wird und somit einer weiteren Entzündungsreaktion entgegenwirkt und vorbeugt.

Es bleibt die Frage, welche Struktur der Probiotika als Initiator für die veränderte Immunreaktion anzusehen ist. Interessant ist in diesem Zusammenhang in der vorliegenden Untersuchung, dass eine Stimulation der PBMNC mit Zelltrümmern, die Bakterienwandbestandteile wie Peptidoglykane, Lipoteichoidsäuren und Lipopolysaccharide enthalten, eine durchweg höhere Kapazität zur Zytokinstimulation aufweist als die mit zytoplasmatischen Anteilen in den Zellextrakten. Dies deutet daraufhin, dass auch der positive Einfluss der Probiotika auf die Immunreaktion über Antigenrezeptoren extra- und intrazellulär vermittelt

wird. Zu diesem Zweck wurden PBMNC verwendet, die im Gegensatz zu LPMNC leichter zu generieren sind und sowohl TLR2 als auch TLR4 sowie CD14 exprimieren, die nachweislich die Immunantwort auf mikrobielle Komponenten wie Peptidoglykan und Lipoteichonsäure vermitteln (Ulevitch RJ 1999). Eine Veränderung der Immunantwort entlang dieser Signalketten über TLR (extrazellulär) und zum Beispiel NOD-Proteine, die als intrazelluläre Sensoren für bakterielle Antigene fungieren und den NF-κB-Signalweg beeinflussen können, scheint wahrscheinlich. Hierfür spricht insbesondere auch der Nachweis bestimmter Mutationen des NOD2-Gens, die mit dem Auftreten des Morbus Crohn assoziiert sind (Hampe et al., 2002, Hugot et al., 2001). Eine Ursache für die Entstehung und Aufrechterhaltung der CED scheint somit eine durch genetische Prädisposition und ergänzende Umweltfaktoren fehlgeleitete Signalkaskade in der Aktivierung und Erhaltung einer Immunreaktion zu sein. Diesen Prozess scheinen Probiotika durch noch nicht vollständig geklärte Mechanismen zumindest zu einem Teil aufzufangen.

Ein weiterer interessanter Aspekt der vorliegenden Studie ist die aufgezeigte Dosis-Wirkungs-Beziehung einzelner Probiotika-Familien oder -Stämme. In der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie, in der VSL#3 zur Remissionserhaltung bei Pouchitis angewendet wurde, wurde die Hypothese einer Dosis-Wirkungs-Beziehung aufgestellt (Gionchetti et al., 2000). Diese beruhte auf der schlichten Beobachtung, dass sehr hohe Konzentrationen der Probiotika offensichtlich einen sehr guten klinischen Erfolg erbrachten. Eine Erklärung zu den Hintergründen der gewählten Konzentration wurde jedoch nicht gegeben. Die hier dargelegten Ergebnisse der Untersuchung anhand von PBMNC zeigen zumindest für einige Bakterienstämme aus dem oben genannten VSL#3 eindeutig eine Dosisabhängigkeit der Stimulation der Zytokinfreisetzung. Interessanterweise lässt sich hierbei für die Laktobakterien eine konzentrationsabhängig ansteigende Sekretion der gemessenen Zytokine sowohl für Zelltrümmer als auch Zellextrakt erkennen, die jedoch insgesamt erst ab einer im Verhältnis zu anderen Stämmen sehr hohen Konzentration beginnt. So stimulierten die Zelltrümmer von *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* und *L. plantarum* die PBMNC bereits in Konzentrationen größer als 10^4 CFU/ml, wobei die Stämme *L. acidophilus* und *L. casei* eine Stimulationskapazität erst ab Konzentrationen in Höhe von 10^5 und 10^6 CFU/ml zeigten. Die insgesamt schwache oder fehlende Reaktion auf Konzentrationen bis 10^5 oder 10^6 CFU/ml war so nicht zu erwarten gewesen. Das Phänomen ließ sich im Rahmen dieser Studie in den Proben der verschiedenen Blutspender reproduzieren und zeigte sich bei allen hier untersuchten Stämmen der Laktobakterien. Als mögliche Erklärung könnte eine

immunologische Toleranz der mononukleären Zellen gegenüber Laktobakterien bestehen. So konnte in einer Studie nachgewiesen werden, dass *L. casei* subsp. *rhamnosus* (*L. GG*), der in der vorliegenden Arbeit die geringste Zytokininduktionskapazität unter den Laktobakterien zeigte, eine immunologische Toleranz in Granulozyten nach oraler Zufuhr über mehrere Wochen induzierte (Schultz et al. 2004). Da Laktobakterien normalerweise zu den frühen Besiedlern des menschlichen Gastrointestinaltraktes gehören (Berg RD, 1996), könnte eine Toleranz gegenüber niedrigen Konzentrationen von Laktobakterien generell vorhanden sein.

Die untersuchten Bifidobakterien zeigten einen weiteren interessanten Aspekt der dosisabhängigen Zytokinstimulation. Die Freisetzung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine wurde in signifikantem Maße stärker stimuliert als durch die untersuchten Laktobakterien, was auch anhand der Toleranztheorie zu erwarten wäre. Zudem führte die höchste Konzentration der Zelltrümmer der Bifidobakterien zu einem Abfall der Zytokinfreisetzung durch die PBMNC im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen. Für den Zellextrakt ließ sich dies hingegen nicht reproduzieren. Ob dieses Phänomen nach Inkubation der Zellen mit hoch konzentrierten Zelltrümmern der Bifidobakterien mit einer Deletion oder Apoptose zusammenhängt, bleibt unklar. Da jedoch eine Verbindung der Probiotikawirkung zu TLR2 und CD14 als Antigendetektoren und Rezeptoren für Bakterienwandbestandteile auf PBMNC sowie dem NF- κ B-Signalweg zu bestehen scheint, ist auch die konzentrationsbedingte Auslösung einer Apoptosereaktion auf diesem Wege möglich. Die zuvor durchgeführte Testung auf Lebensfähigkeit der PBMNC lässt zwar Informationen über die Funktionsfähigkeit der Zellmembran zu, jedoch nicht über den metabolischen Zustand der untersuchten Zelle. Deshalb können bereits initiierte und zum Zelltod führende Signale nicht erfasst und beurteilt werden. Diese Beobachtung im Rahmen der Untersuchung hinsichtlich einer Dosisabhängigkeit unterstreicht noch einmal die Hypothese der gravierenden Rolle der TLR-NOD-NF- κ B-Signalwege in immunkompetenten Zellen insbesondere für die Genese, aber auch für Wirkmechanismen verschiedener Therapeutika der CED (Schreiber et al., 1998). Eine eindeutige Erklärung für die gute Wirksamkeit einiger probiotischer Therapeutika, die derzeit als standardisierte Therapie oder in klinischen Studien Anwendung finden, gibt es derzeit noch nicht. Ebenso lässt sich keine eindeutige Ursache für die gute Wirksamkeit eines einzelnen Stammes (*E. coli* Nissle, Mutaflor®) einerseits und andererseits die ebenso gute Wirksamkeit einer ganzen Gruppe verschiedener probiotischer Bakterien in höchster Konzentration finden. Auch in der vorliegenden Arbeit, die sich zur Aufgabe machte, die Kapazitäten der einzelnen Bakterienstämme der Mixtur VSL#3 zu prüfen, können

letztendlich nur orientierende Ergebnisse dargelegt werden. Bemerkenswert ist, dass die stark stimulierenden Keime aus VSL#3 und *E. coli Nissle* klinisch erfolgreich eingesetzt werden (Bibiloni et al., 2005; Gionchetti et al., 2000; Kruis et al., 1997; Rembacken et al., 1999), jedoch *L. GG*, der in der vorliegenden Arbeit keine Stimulationsfähigkeit zeigte, auch klinisch keinen Effekt hat (Bousvaros et al., 2005; Prantera et al., 2002; Schultz et al., 2004).

Der bereits zuvor als Monotherapeutikum erfolgreich angewendete *E. coli Nissle* zeigte sich auch in dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchsaufbau als äußerst potenter Aktivator einer Immunreaktion im Verhältnis zu relativ geringeren Kapazitäten der Bifido- und Laktobakterien. Es bleibt also die Frage bestehen, worauf sich die mittels Mutaflor® und VSL#3 ähnlich guten klinischen Erfolge bei anscheinend unterschiedlicher In-vitro-Stimulationskapazität begründen. Hierzu bedürfte es einer verschiedenen Konzentrationen einbeziehenden Untersuchung der klinischen Effektivität von Mutaflor® im Vergleich zu VSL#3 im gleichen Patientenkollektiv. Bislang existieren die besten Ergebnisse für Mutaflor® bei Patienten mit Colitis ulcerosa und für VSL#3 bei Patienten mit Pouchitis. Obwohl die Erkrankungen unter der Entität der CED zusammengefasst werden, könnten sich gerade durch die veränderte Darmpassage bei Zustand nach Pouch-Anlage und die veränderte Zusammensetzung der Mikroflora deutliche Unterschiede in der Reaktion auf Probiotika ergeben.

Des Weiteren ergaben sich in der Untersuchung der Dosisabhängigkeit einer Immunreaktion auf die einzelnen Probiotika deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen und vor allem auch innerhalb eines Stammes für die einzelnen gemessenen Zytokine. Um anhand dieser Daten eine sinnvolle Empfehlung für die geeignete Konzentration der Therapeutika zu geben, sind aus diesem Grunde weitere Studien notwendig, um den Stellenwert der einzelnen beteiligten Zytokine genauer zu bestimmen. Anhand der Daten erscheint es sinnvoll, aufgrund der gemessenen IL-10-Werte, *E. coli Nissle* anzuwenden. Dieser Stamm zeigt hier eine dosisabhängige Zunahme der Zytokininduktion bis zu einer Konzentration von 10^7 CFU/ml und in höheren Konzentrationen einen drastischen Abfall. Es wäre also darauf zu achten, bei einer Anwendung von *E. coli Nissle* eine möglichst hohe, jedoch nicht zu hohe Dosis anzuwenden, um einen bestmöglichen Erfolg zu erzielen. In der klinischen Anwendung ist eine solche obere Grenzdosis jedoch noch nicht bekannt und bedarf der weiteren Untersuchung. Bei den Bifidobakterien zeigen sich ganz ähnliche, wenn auch insgesamt etwas geringere Stimulationskapazitäten, zumindest für die Zelltrümmer, weshalb hier

ähnliche Empfehlungen gelten könnten. Die Laktobakterien entwickeln erst ab sehr hohen Konzentrationen eine Stimulationskapazität, was eventuell auf eine mögliche Toleranz der PBMNC gegenüber den Laktobakterien herrührt. Damit nehmen diese in der Therapie oder Remissionserhaltung der CED eine untergeordnete Rolle ein. Kombinationspräparate aus *E. coli Nissle* und Bifidobakterien ohne Laktobakterien erscheinen somit am erfolgversprechendsten. Es gibt zwar keinen Anhalt für eine schädigende Wirkung der Laktobakterien in einer Probiotikakombination, der Wegfall dieser Probiotika-Familie würde jedoch die Herstellung entsprechender Präparate bereits erleichtern.

Die hier vorgestellte Untersuchung auf Unterschiede zwischen der Verwendung der Zelltrümmer, vor allem die Zellwand mit ihren für die Antigenerkennung besonders wichtigen Bestandteilen Lipopolysaccharide, Lipoteichonsäure und Peptidoglykane, und der Verwendung der Zellextrakte mit den im Zytoplasma gelösten Substanzen erbrachte relativ eindeutige Ergebnisse. Bis auf *E. coli Nissle*, der so gut wie keine Unterschiede in der Zytokinstimulation zwischen Zelltrümmern und Zellextrakt aufwies, zeigten die übrigen untersuchten Bakterienstämme eine jeweils stärkere Stimulationskapazität für die Zelltrümmer. Dieses Phänomen ist durch die in den Zelltrümmern enthaltenen und bereits oben genannten bakterientypischen Antigene zu erklären, die zu einer schnelleren Aktivierung der entsprechenden immunkompetenten Zellen führen. Für die therapeutische Anwendung von Probiotika hieße dies, dass eine aufwendige Auftrennung der Bakterienzellbestandteile keinen weiteren Nutzen erbringt und somit unterlassen werden könnte. Allerdings ist in dem vorliegenden Versuchsaufbau der Aspekt einer lebenden und somit auch interaktionsfähigen Bakterienzelle nicht berücksichtigt, weshalb eine Wiederholung der Versuchsreihe mit lebenden Probiotika der entsprechenden Stämme sinnvoll erscheint, um einen Einblick zu erhalten, ob lediglich die Zellbestandteile oder auch bestimmte Interaktionen des Bakteriums mit den PBMNC die Zytokinproduktion induzieren.

4.4 Limitationen

Die Wahl der stimulierten Zellen in Form von PBMNC gesunder Probanden erscheint zunächst bei einer Untersuchung, die sich auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen bezieht, deren Immunreaktion hauptsächlich durch immunkompetente Zellen vor Ort katalysiert wird, nicht vollständig adäquat. Um einen genauen Einblick in die immunologischen Abläufe und Signalwege bei CED zu bekommen, ist eine Untersuchung der ortsansässigen LPMNC im Vergleich zwischen entzündetem und nicht entzündetem Gewebe

von an CED Erkrankten einerseits und dem Gewebe Gesunder andererseits sicherlich die beste Methode (Reinecker et al., 1993). Diese ist jedoch mit einem enormen Mehraufwand verbunden und die Voraussetzung des entsprechenden Patientenkontingentes sowie gesunder Probanden, die sich mit einer Ileokoloskopie und Gewebeprobeentnahmen einverstanden erklären, muss gewährleistet sein. Da nach der Literatur zumindest keine gravierenden Unterschiede zwischen PBMNC und LPMNC in der Reaktion auf Stimulationen in vitro (zum Beispiel mit IL-10) bestehen (Schreiber et al., 1995), erscheint die Wahl der PBMNC aufgrund der wesentlich besseren Verfügbarkeit und einfacheren Verarbeitung gerechtfertigt. Auch war das Ziel dieser Arbeit zunächst eine Bestandsaufnahme über die generellen Kapazitäten von Probiotika in Bezug auf die Auslösung einer Immunreaktion, sodass die Veränderungen bei manifester CED noch nicht im Zentrum des Interesses standen. Es sollte jedoch in weiteren Schritten der Bezug zu immunologischen Abläufen nach Probiotikastimulation in Zellen erkrankter Patienten unter o. g. Bedingungen angestrebt werden.

Zudem ist unter dem Aspekt, dass Zellen gesunder Probanden untersucht wurden, eine Aussage über die Reaktionen bei zusätzlicher Stimulation mit bakteriellen Antigenen, wie zum Beispiel LPS, wie sie bei chronischen Entzündungen bestehen, hier nicht möglich und führte möglicherweise aus diesem Grunde zu keinen verwertbaren Ergebnissen. Vor dem Hintergrund der in klinischen Studien nachgewiesenen prophylaktischen Eigenschaften von probiotischen Bakterien bei entzündlichen Erkrankungen ist es interessant, dass keiner der untersuchten Bakterienstämme einen hemmenden Effekt auf die Zytokinfreisetzung von mit LPS stimulierten PBMNC hat, obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass Probiotika einen solchen hemmenden Effekt auf epitheliale Zellen ausüben (Bilsborough et Viney, 2004, Lammers et al., 2002). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass die epitheliale Oberfläche des Gastrointestinaltraktes bei CED bereits verletzt ist, wenn das bakterienzugehörige LPS Kontakt zu PBMNC bekommt. Probiotika haben einen hemmenden Effekt auf epitheliale Zellen und somit auf eine noch intakte epitheliale Oberfläche des Gastrointestinaltraktes, weisen jedoch keine solche Wirkung auf mononukleäre Zellen auf, mit denen Bakterien und ihr LPS erst einen Kontakt nach bereits erfolgter Schädigung des Darmepithels bekommen. Diese Tatsache unterstreicht die prophylaktische Wirkung der Probiotika und könnte ihre fehlende Wirkung im Stadium der akuten Entzündung in klinischen Studien erklären.

Dies macht jedoch auch deutlich, dass eine Ko-Inkubation von Probiotika mit LPS und PBMNC vielleicht nicht der richtige Ansatz ist, um eine Aussage über eine mögliche Hemmung der durch Pathogene angeregten Zytokinproduktion durch Probiotika aufzudecken.

Da nach Datenlage innerhalb der Immunreaktion einer Zelle diese Abläufe einer ganz spezifischen zeitlichen Kinetik unterworfen sind, ist die in der vorliegenden Studie für alle drei gemessenen Zytokine gleich angesetzte Inkubationszeit der PBMNC und somit auch die Produktions- und Sekretionszeit von 36 h ein Kompromiss. So ist bekannt, dass IL-10 im Verhältnis relativ spät sezerniert wird (max. ca. 48 h nach Stimulus), IL-1 β und TNF- α jedoch relativ früh nach 24 h. Die Sekretion von IL-10 wirkt jedoch auf die PBMNC zurück und bewirkt dort die Downregulation von TNF- α und IL-1 β . Es kommt also innerhalb von 24 bis 48 h zu wichtigen Veränderungen im Verhältnis der sezernierten Zytokine zueinander. Deshalb erscheint eine zeitlich gestaffelte Analyse der Zytokinmengen in nachfolgenden Studien besonders wichtig, um ein detailliertes Bild der entsprechenden Signalvorgänge durch Zytokine nachzuzeichnen.

Zudem ist eine solche Beobachtung über die Zeit nur aussagekräftig, wenn die Untersuchungen probanden- bzw. probenbezogen durchgeführt werden. Da zwischen verschiedenen Organismen auch Unterschiede in den Abläufen der Immunreaktion entsprechend genetischer Ausstattung, Umweltfaktoren oder aktuellem Immunstatus zu erwarten sind, ist eine strikte probandenbezogene Auswertung über die Zeit unabdingbar, um die Entwicklung der Verhältnisse einzelner Zytokine über die Zeit beschreiben zu können. Eine probandenbezogene Auswertung erfolgte in dieser Studie nicht. Aufgrund mehrfach wiederholter Experimente zu jeweils gleicher Zeit und anschließender Mittelung sind jedoch grundsätzliche Aussagen über Tendenzen in der Stimulationskapazität einzelner Probiotika bzw. der verschiedenen Probiotikastämme zu einem Zeitpunkt mitten in der Sekretionsphase möglich.

Da es sich um eine erste Studie in der systematischen Analyse der Stimulation spezifischer Immunreaktionen durch probiotische Bakterien handelt, wurden noch viele Aspekte im Set-up ausgelassen. Aufgrund der Ergebnisse dieser ersten Übersichtsarbeit ist es nun jedoch möglich, in weiteren Untersuchungen wichtige Aspekte, wie oben geschehen, herauszuarbeiten und Folgestudien zu planen. Aus diesem Grunde ist die Studie trotz wenig überraschender Ergebnisse als erfolgreich anzusehen.

Insbesondere können die Ergebnisse der vorliegenden Studie herangezogen werden, um zu einer besseren Differenzierung zwischen klinischer Wirksamkeit und Unwirksamkeit beizutragen.

Anhand der vorliegenden Daten bezüglich der Stimulationskapazität für Immunreaktionen einzelner Bakterien können neue Kombinationen in der Probiotikatherapie erstellt werden, die zu einer verbesserten klinischen Wirksamkeit führen, wie zum Beispiel eine Kombination aus den potenten und hochpotenten Stämmen der Bifidobakterien sowie *E. coli Nissle*.

Auch die in dieser Studie angewendete Methode zur Messung der Stimulationskapazität der einzelnen Bakterien hat sich als funktionstüchtig erwiesen. So könnte diese in Zukunft zum Beispiel als Screening-Methode für weitere immunstimulierende Bakterien Anwendung finden.

4.5 Schlussfolgerung

Als Schlussfolgerung kann festgestellt werden, dass probiotische Bakterien, die in klinischen Studien zu entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes als Therapeutika oder Prophylaktika mit Erfolg angewendet wurden, unterschiedliche Charakteristika in der Stimulation zur Ausschüttung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine durch PBMNC aufweisen. Diese Charakteristika sind sowohl familien- als auch speziesspezifisch und weisen hierin zudem eine spezifische Dosisabhängigkeit auf. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass es von Bedeutung ist, zwischen den verschiedenen probiotischen Bakterienstämmen zu unterscheiden, die in klinischen Studien mit dem Ziel verwendet werden, eine immunologische Reaktion hervorzurufen und diese dann zu untersuchen. Ebenso könnten die Ergebnisse dieser Studie eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse klinischer Untersuchungen geben, in denen Probiotika mit verschiedener Zusammensetzung der Bakterienstämme und in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet wurden. Es sollte somit Ziel sein, die bislang positiven klinischen Ergebnisse auf die Basis fundierter Grundlagenforschung anhand der spezifischen verwendeten Probiotika zu stellen. Dementsprechend sollten zu den einzelnen Bakterienstämmen jeweils gleich aufgebaute Versuchsreihen zur Immunreaktion von betroffenem und nicht betroffenem Gewebe von an CED Erkrankten sowie Gesunden durchgeführt werden. Eine Untersuchung jeweils nur innerhalb einer der zu den CED gehörenden Erkrankungen sollte zwingend sein, da aufgrund der bewiesenermaßen nicht für alle Erkrankungen dieser Entität gleichen Pathogenese auch

gravierende, nicht untereinander vergleichbare Unterschiede in den Immunreaktionen auftreten können. Zudem sollten die Untersuchungen die Konzentrationen der Stimulantien sowie den zeitlichen Aspekt der provozierten Immunreaktion in allen Facetten beleuchten.

Ziel für die Zukunft sollte es sein, die bereits erfolgreiche und für die Betroffenen äußerst schonende Behandlung mit Probiotika durch besseres Grundlagenwissen zu optimieren, insbesondere im Hinblick auf die immer weiter ansteigende Anzahl betroffener und bereits in jungen Jahren meist schwer in ihrer Lebensqualität eingeschränkter Menschen.

5 Zusammenfassung

Ziel: Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, ob periphere mononukleäre Blutzellen (PBMNC) durch Zelltrümmer oder Zellextrakte verschiedener Probiotika-Stämme zur Ausschüttung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine stimuliert werden können und dieser Effekt für alle untersuchten Probiotikaspezies ähnlich oder speziesspezifisch unterschiedlich ist.

Methoden: Drei Stämme von Bifidobakterien, vier Stämme aus der Familie der Laktobakterien und *E. coli Nissle* wurden mittels Ultraschall zerstört und durch Zentrifugation in Zelltrümmer und Zellextrakte aufgetrennt. PBMNC von gesunden Blutspendern wurden nach dem Dichtegradienten aufgetrennt und für 36 h entweder mit den Zelltrümmern oder dem Zellextrakt der einzelnen Probiotika-Spezies in Konzentrationen von 10^2 bis 10^8 CFU/ml inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und mittels ELISA Interleukin (IL)-10, Interleukin (IL)-1 β und Tumornekrosefaktor (TNF)- α gemessen.

Ergebnisse: Abhängig von der Familie der Probiotika zeigten die einzelnen Stämme unterschiedliche Stimulationsmuster. Mit Ausnahme von *L. casei* wies der Zellextrakt von Bifidobakterien und Laktobakterien eine geringere Stimulationskapazität auf als die Zelltrümmer. Hingegen zeigten Zellextrakt und Zelltrümmer von *E. coli Nissle* vergleichbare und insgesamt signifikant größere Stimulationskapazitäten als Bifidobakterien und Laktobakterien. Die höchste relative Stimulationskapazität für das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 zeigte *E. coli Nissle*.

Schlussfolgerungen: Die Inkubation probiotischer Spezies, die sich in klinischen Untersuchungen entzündlicher Darmerkrankungen als erfolgversprechend erwiesen haben, mit immunkompetenten Zellen führt zu speziesspezifischen Reaktionen. Es konnte eine hohe IL-10-Ausschüttung nach Stimulation mit Zelltrümmern von Bifidobakterien und *E. coli Nissle* nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen überein mit positiven Effekten von Bifidobakterien und *E. coli Nissle* in klinischen Studien zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu negativen Ergebnissen in Verbindung mit Laktobakterien.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406(6797): 782–787
- (2) Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Rev Immunol* 2003;3(9): 745–756
- (3) Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, Bunce M, Jewell DP. Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15(6): 731–748
- (4) Ainley C, Cason J, Slavin BM, Wolstencroft RA, Thompson RPH. The influence of zinc status and malnutrition on immunological function in Crohn's disease. *Gastroenterol* 1991;100(6): 1616–1625
- (5) Amre DK, Lambrette P, Law L, Krupoves A, Chotard V, Costea F, Grimard G, Israel D, Mack D, Seidman EG. Investigating the hygiene hypothesis as a risk factor in pediatric onset Crohn's disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2006;101(5): 1005–1011
- (6) Andersson R, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2001;344(11): 808–814
- (7) Benjamin D, Knoblach TJ, Dayton MA. Human Interleukin 10: B cell lines derived from patients with AIDS and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin 10. *Blood* 1992;80(5): 1289–1298
- (8) Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 1996;4(3): 430–435
- (9) Bernstein CN, Rawsthorne P, Cheang M, Blanchard JF. A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am J Gastroenterol* 2006;101(5): 993–1002
- (10) Bernstein CN, Shanahan F. Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut* 2008;57(9): 1185–1191

- (11) Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2005;100(7): 1539–1546
- (12) Bilsborough J, Viney JL. Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease. *Gastroenterol* 2004;127(1): 300–309
- (13) Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 1991;174(6): 1549–1555
- (14) Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968;97: 77–89
- (15) Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72(9): 3666–3670
- (16) Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 1992;256(5053): 97–100
- (17) Chadwick VS, Anderson RP. Inflammatory products of commensal bacteria and gastrointestinal disorders. *Dig Dis* 1990;8(5): 253–268
- (18) Cunha FQ, Moncada S, Liew FY. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon- γ in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182(3): 1155–1159
- (19) Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 2004;3(5): 394–400
- (20) Debets R, Timans JC, Homey B, Zurawski S, Sana TR, Lo S, Wagner J, Edwards G, Clifford T, Menon S, Bazan JF, Kastelein RA. Two novel IL-1 family members, IL-1 delta and IL-1 epsilon, function as an antagonist and agonist of NF-kappa B activation through the orphan IL-1 receptor-related protein 2. *J Immunol* 2001;167(3): 1440–1446

- (21) Desai HG, Gupte PA. Increasing incidence of Crohn's disease in India: is it related to improved sanitation? *Indian J Gastroenterol* 2005;24(1): 23–24
- (22) de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174(5):1209–1220
- (23) de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991;174(4): 915–924
- (24) D'Haens G, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early lesions caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum in Crohn's disease. *Gastroenterol* 1998;114(2): 262–267
- (25) Dignass A, Preiss JC, Aust DE, Autschbach F, Ballauff A, Barretton G, Bokemeyer B, Fichtner-Feigl S, Hagel S, Herrlinger KR, Jantschek G, Kroesen A, Kruis W, Kucharzik T, Langhorst J, Reinshagen M, Rogler G, Schleiermacher D, Schmidt C, Schreiber S, Schulze H, Stange E, Zeitz M, Hoffmann JC, Stallmach A. Aktualisierte Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa 2011 – Ergebnisse einer Evidenzbasierten Konsensuskonferenz. *Z Gastroenterol* 2011;49(9): 1276–341.
- (26) Dillon SR, Gross JA, Ansell SM, Novak AJ. An April to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nature Rev Drug Discov* 2006;5(3): 235–242
- (27) Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 1994;8(15): 1314–1325
- (28) Dinarello CA. Biologic basic for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87(6): 2095–2147
- (29) Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 1998;16(5-6): 457–499
- (30) Dinarello CA. The Il-1 family and inflammatory diseases. *Clin exp Rheumatol* 2002;20(5 Suppl 27): S1–S13

- (31) Ding L, Shevach EM. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol* 1992;148(10): 3133–3139
- (32) Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewew K, Buschenfelde K-HM. Tolerance exists towards resident intestinal flora but it is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995;102(3): 448–455
- (33) Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, Buschenfelde K-HM, Neurath M. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur J Immunol* 1996;26(4): 934–938
- (34) Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JJ, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314(5804): 1461–1463
- (35) Ekbom A, Wakefield AJ, Zack M, Adami HO. Perinatal measles infection and subsequent Crohn's disease. *Lancet* 1994;344(8921): 508–510
- (36) Ekbom, A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 1990;323(18): 1228–1233
- (37) Endres S, Cannon JG, Ghorbani R, Dempsey RA, Sisson SD, Lonnemann G, Van der meer J, Wolff SM, Dinarello CA. In vitro production of IL 1 beta, IL 1 alpha, TNF and IL2 in healthy subjects: distribution, effect of cyclooxygenase inhibition and evidence of independent gene regulation. *Eur J Immunol* 1989;19(12): 2327–2333
- (38) Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, Andersson R, Willén R, Jeppsson B, Molin G, Bengmark S. Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat. *Digestion* 1993;54(4): 248–255
- (39) Fiocchi C. Inflammatory Bowel Disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterol* 1998;115(1): 182–205
- (40) Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991;146(10): 3444–3451

- (41) Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard MH, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147(11): 3815–3822
- (42) Fiorucci S, Distrutti E, Mencarelli A, Barbanti M, Palazzini E, Morelli A. Inhibition of intestinal bacterial translocation with rifamixin modulates lamina propria monocytic cells reactivity and protects against inflammation in a rodent model of colitis. *Digestion* 2002;66(4): 246–256
- (43) Franceschi S, Panza E, La Vecchia C, Parazzini F, Decarli A, Bianchi Porro G. Nonspecific inflammatory bowel disease and smoking. *Am J Epidemiol* 1987;125(3): 445–452
- (44) Franke A, Hampe J, Rosenstiel P, Becker C, Wagner F, Häsler R, Little RD, Huse K, Ruether A, Balschun T, Wittig M, ElSharawy A, Mayr G, Albrecht M, Prescott NJ, Onnie CM, Fournier H, Keith T, Radelof U, Platzer M, Mathew CG, Stoll M, Krawczak M, Nürnberg P, Schreiber S. Sytematic Association Mapping Identifies NELL1 as a Novel IBD Disease Gene. *PLoS ONE* 2(8): e691
- (45) Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitric oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol* 1992;148(6): 1792–1796
- (46) Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 1994;343(8900): 766–767
- (47) Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenetro* 2000;119(2): 305–309
- (48) Gionchetti P, Amadini C, Rizzello F, Venturi A, Campieri M. Review article: treatment of mild to moderate ulcerative colitis and pouchitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16 (Suppl 4): 13–19
- (49) Gionchetti P, Rizzello F, Habal F, Morselli C, Amadini C, Romagnoli R, Campieri M. Standard treatment of ulcerative colitis. *Dig Dis* 2003;21(2): 157–167

- (50) Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol* 2003;24(12): 652–658
- (51) Giri JG, Lomedico PT, Mizel SB. Studies on the synthesis and secretion of interleukin 1. *J Immunol* 1985; 134(1): 343–349
- (52) Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithel cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 2002;277(44): 41701–41705
- (53) Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006;12(23): 3668–3672
- (54) Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*, 2001;357(9272): 1925–1928
- (55) Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häsler R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007;39(2): 207–211
- (56) Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP, Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 1990;343((6256): 336–340
- (57) Hansen R, Thomson JM, El-Omar EM, Hold GL. The role of infection in the aetiology of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2010;45(3): 266–276
- (58) Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor superfamily: players, rules and games. *Immunology* 2005;115(1): 1–20

- (59) Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF, Dang MN, Vieira P, de Vries J, Spits H, Mosmann TR, Moore KW. Expression of IL-10 activity by Epstein-Barr Virus Protein BCRFL. *Science* 1990;250(4982): 830–832
- (60) Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379(6568): 821–823
- (61) Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411(6837): 599–603
- (62) Hurst RD, Chung TP, Rubin M, Michelassi F. The implications of acute pouchitis on the long-term functional results after restorative proctocolectomy. *Inflamm Bowel Dis* 1998;4(4): 280–284
- (63) Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 2000;50(3): 184–195
- (64) Keighley MRB. Review article: the management of pouchitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1996;10(4): 449–457
- (65) Keranen U, Luukkonen P, Jarvinen H. Functional results after restorative proctocolectomy complicated by pouchitis. *Dis Colon Rectum* 1997;40(7): 764–769
- (66) Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Khan TA, Moore KW. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol* 1992;148(11): 3618–3623
- (67) Komatsu S, Panes J, Grisham MB, Russell JM, Mori N, Granger DN. Effects of intestinal stasis on intercellular adhesion molecule 1 expression in the rat: role of enteric bacteria. *Gastroenterol* 1997;112(6): 1971–1978

- (68) Kruis W, Schütz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11(5): 853–858
- (69) Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75(2): 263–274
- (70) K.M Lammers, U Helwig, E Swennen, F Rizzello, A Venturi, E Caramelli, M.A Kamm, P Brigidi, P Gionchetti, M Campieri, Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells, *The American Journal of Gastroenterology*, Volume 97, Issue 5, May 2002, Pages 1182–1186
- (71) Lashner BA, Loftus EV Jr. True or false? The hygiene hypothesis for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2006;101(5): 1003–1004
- (72) Lesage S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002;70(4): 845–857
- (73) Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Järnerot G. Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut* 1988;29(3): 352–357
- (74) Locksley RM, Lilleen N, Leonardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104(4): 487–501
- (75) Lohmuller JL, Pemberton JH, Dozois RR, Ilstrup DM, van Heerden J. Pouchitis and extraintestinal manifestation of inflammatory bowel disease after ileal pouch-anal anastomosis. *Ann Surg* 1990;211(5): 622–629
- (76) Lonnemann G, Endres S, Van der Meer JW, Cannon JG, Koch KM, Dinarello CA. Differences in the synthesis and kinetics of release of interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta and tumor necrosis factor from human mononuclear cells. *Eur J Immunol* 1989;19(9): 1531–1536
- (77) Madden MV, Farthing MJ, Nicholls RJ. Inflammation in the ileal reservoir: „pouchitis.“ *Gut* 1990;31(3): 247–249

- (78) Madsen KL, Doyle JS, Tavernini MM, Jewell LD, Rennie RP, Fedorak RN. Antibiotic therapy attenuates colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterol* 2000;118(6): 1094–1105
- (79) Malin M, Suomalainen H, Saxelin M, Isolauri E. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus GG*. *Ann Nutr Metab* 1996;40(3): 137–145
- (80) Maykel JA, Hagermann G, Mellgren AF, Li SY, Baxter NN, Madorff RD. Crohn's colitis: the incidence of dysplasia and adenocarcinoma in surgical patients. *Dis Colon Rectum* 2006;49(7): 950–957
- (81) McGovern DP, Hysi P, Ahmad T, van Heel DA, Moffatt MF, Carey A, Cookson WO, Jewell DP. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD 4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet* 2005;14(10): 1245–1250
- (82) Meagher AP, Farouk R, Dozois RR et al. J ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis: complications and long-term outcome in 1310 patients. *BR J Surg* 1998;85(6): 800–803
- (83) Mendoza JL, Lana R, Díaz-Rubio M. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and its relationship with Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2009;15(4): 417–422
- (84) Miehsler W, Gasche C. Standard therapy of Crohn's disease. *Dig Dis* 2003;21(2): 146–156
- (85) Miettinen M, Vuopio-Varkila J, Varkila K. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect Immun* 1996; 64(12): 5403–5405
- (86) Miettinen M, Matikainen S, Vuopio-Varkila J, Pirhonen J, Varkila K, Kurimoto M, Julkunen I. *Lactobacilli* and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 1998;66(12): 6058–6062
- (87) Mikhailov TA, Furner SE. Breastfeeding and genetic factors in the etiology of inflammatory bowel disease in children. *World J Gastroenterol* 2009;15(3): 270–279

- (88) Molodecky NA, Kaplan GG. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol* 2010;6(5): 339–346
- (89) Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11: 165–190
- (90) Moskowitz RL, Sheperd NA, Nicholls RJ. An assessment of inflammation in the reservoir after restorative proctocolectomy with ileoanal ileal reservoir. *Int J Colorectal Dis*;1986;1(3): 167–174
- (91) Nicholls RJ, Banerjee AK. Pouchitis. Risk factors, etiology, and treatment. *World J Surg* 1998;22(4): 347–351
- (92) Niess JH, Reinecker HC. Lamina propria dendritic cells in the physiology and pathology of the gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21(6): 687–691
- (93) Nikolaus S, Schreiber S. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol* 2007;133(5): 1670–1689
- (94) Ohkusa T, Nomura T, Sato N. The role of bacterial infection in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intern Med* 2004;43(7): 534–539
- (95) Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995;378(6552): 88–91
- (96) Orholm M, Fonager K, Sorensen HT. Risk of ulcerative colitis and Crohn's disease among offspring of patients with chronic inflammatory bowel disease. *Am J gastroenterol* 1999; 94(11): 3236–3238.
- (97) Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Fölsch UR, Timmis KN, Schreiber S. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 2004;53(5): 685–693
- (98) Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004;36(5): 471–475

- (99) Philpott DJ, Girardin SE, Sansonetti PJ. Innate immune responses of epithelial cells following infection with bacterial pathogens. *Curr Opin Immunol* 2001;13(4): 410–416
- (100) Pirzer U, Schonhaar A, Fleischer B, Herrmann E, Buschenfelde K-HM. Reactivity of infiltrating T lymphocytes with microbial antigens in Crohn's disease. *Lancet* 1991;338(8777): 1238–1239
- (101) Prantera C, Scribano ML, Falasco G, Andreoli A, Luzzi C. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomized controlled trial with *Lactobacillus GG*. *Gut* 2002;51(3): 405–409
- (102) Ralph P, Nakoinz I, Sampson-Johannes A, Fong S, Lowe D, Min HY, Lin L. IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1992;148(3): 808–814
- (103) Reinecker HC, Steffen M, Witthoeft T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A. Enhanced secretion of tumor necrosis factor- α , IL-6 and IL-1 β by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993;94(1): 174–181
- (104) Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Nonpathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomized trial. *Lancet* 1999;354(9179): 635–639
- (105) Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS, Lindblad K, Steinhart H, Cohen Z, Delmonte T, Kocher K, Miller K, Guschwan S, Kulbokas EJ, O'Leary S, Winchester E, Dewar K, Green T, Stone V, Chow C, Cohen A, Langelier D, Lapointe G, Gaudet D, Faith J, Branco N, Bull SB, McLeod RS, Griffiths AM, Bitton A, Greenberg GR, Lander ES, Siminovitch KA, Hudson TJ. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn's disease. *Nat Genet* 2001;29(2): 223–228
- (106) Romanos J, Samarasekera DN, Stebbing JF, Jewell DP, Kettlewell MG, Mortensen NJ. Outcome of 200 restorative proctocolectomy operations: the John Radcliffe Hospital experience. *Br J Surg* 1997;84(6): 814–818
- (107) Rosenstiel P et al. TNF- α and IFN- γ regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterol* 2003;124(4): 1001–1009

- (108) Roth MP, Petersen GM, McElree C, Feldman E, Rotter JI. Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol* 1989;97: 900–904
- (109) Ruseler-van-Embden JGH, Schouten WR, vanLieshout LMC. Pouchitis: result of microbial imbalance? *Gut* 1994;35(5): 658–664
- (110) Rutgeerts P, Geboes K, Hiele M, Penninckx F, Aerts R, Kerremans R, Vantrappen G. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* 1991;338(8770): 771–774
- (111) Sabbagh L, Snell LM, Watts TH. TNF family ligands define niches for T cell memory. *Trends Immunol* 2007;28(8): 333–339
- (112) Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, Bloom BR. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 1991;254(5029): 279–282
- (113) Sandborn WJ. Pouchitis following ileal pouch-anal anastomosis: definition, pathogenesis, and treatment. *Gastroenterol* 1994;107(6): 1856–1860
- (114) Sandborn WJ, Tremaine WJ, Batts KP, Pemberton JH, Phillips SF. Pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis: a pouchitis disease activity index. *Mayo Clin Proc* 1994;69(5): 409–415
- (115) Sandborn WJ, McLeod R, Jewell DP. Medical therapy for induction and maintenance of remission in pouchitis: a systemic review. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5(1): 33–39
- (116) Sandborn WJ, Colombel JF, Enns R, Feagan BG, Hanauer SB, Lawrance IC, Panaccione R, Sanders M, Schreiber S, Targan S, van Deventer S, Goldblum R, Despaigne D, Hogge GS, Rutgeerts P; International Efficacy of Natalizumab as Active Crohn's Therapy (ENACT-1) Trial Group. Natalizumab induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2005;353(18): 1912–1925
- (117) Sandler R. Epidemiology of inflammatory bowel disease. In Targan S, Shanahan S, eds. *Inflammatory Bowel Disease: from Bench to Bedside*. Baltimore: William & Wilkins, 1994: 5–30
- (118) Sands, BE. Inflammatory bowel disease: past, present, and future. *J Gastroenterol* 2007;42(1): 16–25

- (119) Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics and prebiotics. *Gastroenterol* 2004;126(6): 1620–1633
- (120) Savidge TC, Newman PG, Pan WH, Weng MQ, Shi HN, McCormick BA, Quaroni A, Walker WA. Lipopolysaccharide-induced human enterocyte tolerance to cytokine-mediated interleukin-8 production may occur independently of TLR-4/MD-2 signaling. *Pediatr Res* 2006;59(1): 89–95
- (121) Schaafsma G. State of the art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutr Newsl* 1996;5: 23–24
- (122) Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A, Pinnau R, Bertovich MJ, Nash GS. Increased activation of isolated intestinal lamina propria mononuclear cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol* 1991;101(4): 1020–1030
- (123) Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A. Immunoregulatory role of Interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol* 1995;108(5): 1434–1444
- (124) Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor κ B in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42: 477–484
- (125) Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, Wild G, Williams CN, Nikolaus S, Jacyna M, Lashner BA, Gangl A, Rutgeerts P, Isaacs K, van Deventer SJ, Koningsberger JC, Cohard M, LeBeaut A, Hanauer SB. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's disease IL-10 Cooperative Study Group. *Gastroenterol* 2000;119(6): 1461–1472
- (126) Schreiber S. Genetics of inflammatory bowel disease: a puzzle with contradictions? *Gut* 2000;47(6): 746–747
- (127) Schreiber S, Rutgeerts P, Fedorak RN, Khaliq-Kareemi M, Kamm MA, Boivin M, Bernstein CN, Staun M, Thomsen OØ, Innes A; CDP870 Crohn's Disease Study Group. A randomized, placebo-controlled trial of certolizumab pegol (CDP870) for treatment of Crohn's disease. *Gastroenterol* 2005;129(3): 807–818
- (128) Schrezenmaier J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001;73(2 Suppl): 361S–364S

- (129) Schultz M, Linde HJ, Lehn N, Zimmermann K, Grossmann J, Falk W, Schölmerich J. Immunomodulatory consequences of oral administration of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in healthy volunteers. *J Dairy Res* 2003;70(2): 165–173
- (130) Schultz M, Timmer A, Herfarth HH, Sartor BS, Vanderhoof JA, Rath HC. *Lactobacillus* GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol* 2004;4: 5
- (131) Setti-Carraro P, Ritchie JK, Wilkinson KH, Nicholls RJ, Hawley PR. The first 10 years' experience of restorative proctocolectomy for ulcerative colitis. *Gut* 1994;35(8): 1070–1075
- (132) Shanafelt AB, Miyajima A, Kitamura T, Kastelein RA. The amino-terminal helix of GM-CSF and IL-5 governs a high-affinity binding to their receptors. *EMBO J* 1993;10(13): 4105–4112
- (133) Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet* 2002;359(9300): 62–69
- (134) Shanahan F, Bernstein CN. The evolving epidemiology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2009;25(4): 301–305.
- (135) Sheperd NA, Jass JR, Duval I, Moskowitz RL, Nicholls RJ, Morson BC. Restorative proctocolectomy with ileal reservoir: pathological and histochemical study of mucosal biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1987;40(6): 601–607
- (136) Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterol* 1984;86(1): 174–193
- (137) Solberg IC, Lygren I, Jahnsen J, Aadland E, Høie O, Cvancarova M, Bernklev T, Henriksen M, Sauar J, Vatn MH, Moum B; IBSEN Study Group. Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study). *Scand J Gastroenterol* 2009;44(4): 431–440.
- (138) Stahlberg D, Gullberg K, Liljeqvist L, HELLERS G, Löfberg R. Pouchitis following pelvic pouch operation for ulcerative colitis. Incidence, cumulative risk, and risk factors. *Dis Colon Rectum* 1996;39(9): 1012–1018

- (139) Steidler L, Hans W, Schotte L, Neirynck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000;289(5483): 1325–1355
- (140) Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, Rosenstiel P, Albrecht M, Croucher PJ, Seegert D, Nikolaus S, Hampe J, Lengauer T, Pierrou S, Foelsch UR, Mathew CG, Lagerstrom-Fermer M, Schreiber S. Genetic variation in *DLG5* is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004;36(5): 476–480
- (141) Strachan, DP. Hay fever, hygiene and household size. *Br. Med. J.* 1989;299(6710): 1259–1260.
- (142) Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 1992;148(4): 1143–1148
- (143) Tanaka M, Riddell RH, Saito H, Soma Y, Hidaka H, Kudo H. Morphologic criteria applicable to biopsy specimens for effective distinction of inflammatory bowel disease from other forms of colitis and of Crohn's disease from ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1999 ;34(1): 55–67
- (144) Tancrede C. Role of human interflora in health and disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11: 1012–15
- (145) Thompson NP, Montgomery SM, Pounder RE, Wakefield AJ. Is measles vaccination a risk factor for inflammatory bowel disease? *Lancet* 1995;345(8957): 1071–1074
- (146) Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacol Therapeut* 2008;117(2): 244–279
- (147) Tytgat GN, van Deventer SJ. Pouchitis. *Int J Colorectal Dis* 1988;3(4): 226–228
- (148) Ulevitch, R. J. Endotoxin opens the Tollgates to innate immunity. *Nat Med* 1999;5(2): 144–145.
- (149) Ulisse S, Gionchetti P, D'Alo S, Russo FP, Pesce I, Ricci G, Rizzello F, Helwig U, Cifone MG, Campieri M, De Simone C. Expression of cytokines, inducible nitric

- oxide synthase, and matrix metalloproteinases in pouchitis: effects of probiotic treatments. *Am J Gastroenterol* 2001;96(9): 2691–2299
- (150) Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, Johansson R, Zucconi E, Brigidi P, Matteuzzi D, Campieri M. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13(8): 1103–1108
- (151) Vieira P, de Waal Malefyt R, Dang MN, Johnson KE, et al. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF/IL-10) cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(4): 1172–1176
- (152) von Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis-The epidemiological evidence. *Immunobiology* 2007;212(6): 433–439
- (153) Wakefield AJ, Pittilo RM, Sim R, Cosby SL, Stephenson JR, Dhillon AP, Pounder RE. Evidence of persistent measles virus infection in Crohn's disease. *J Med Virol* 1993;39(4): 345–353
- (154) Webb AC, Collins KL, Auron PE, Eddy RL, Nakai H, Byers MG, Haley LL, Henry WM, Shows TB. Interleukin-1 gene (IL1) assigned to long arm of human chromosome 2. *Lymphokine Res* 1986;5(2): 77–85
- (155) Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991;254(5029): 277–279
- (156) Yamazaki K, McGovern D, Ragoussis J, Paolucci M, Butler H, Jewell D, Cardon L, Takazoe M, Tanaka T, Ichimori T, Saito S, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Lathrop M, Nakamura Y. Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Hum Mol Genet* 2005;14(22): 3499–3509
- (157) Yssel H, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG, Abrams JS, Lahesmaa R, Spits H, de Vries JE. Interleukin 10 is produced by subsets of human CD4⁺ T cell clones and peripheral blood T cells. *J Immunol* 1992;149(7): 2378–2384

- (158) Zheng JJ, Zhu XS, Huangfu Z, Gao ZX, Guo ZR, Wang Z. Crohn's disease in mainland China: a systematic analysis of 50 years of research. *Chin J Dig Dis* 2005;6(4): 175–181

Lebenslauf

Verena Rohleder

Persönliche Daten

Privatanschrift	Friedrichstr. 19 20359 Hamburg
Geburtsdatum:	28.09.1978
Geburtsort:	Pinneberg
Staatsbürgerschaft:	Deutschland

Schulbildung

1989–1998	Johannes-Brahms-Schule Pinneberg mit Abitur
-----------	---

Hochschulstudium

09/1998–06/2005	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
03/2001	Ärztliche Vorprüfung
08/2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2004–08/2004	1. Trimester des Praktischen Jahres Abteilung Innere Medizin im Klinikum Itzehoe

08/2004–11/2004	2. Trimester des Praktischen Jahres Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie und Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie im Klinikum Itzehoe
11/2004–03/2005	3. Trimester des Praktischen Jahres Abteilung für Neurologie im Klinikum Itzehoe
30. Juni 2005	Approbation als Ärztin
Praktika/Famulaturen	
03/1999 und 08/1999	Krankenpflegepraktikum in der Hautklinik der CAU zu Kiel
08/2001	Famulatur im Klinikum Pinneberg, Abteilung für Innere Medizin
09/2002	Famulatur in der hausärztlich/internistischen Praxis Dr. med. Osterkamp in Kiel
02/2003–03/2003	Famulatur im Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung an der Bundesanstalt für Milchforschung, Bereich der ambulanten Diagnostik von Fettstoffwechselstörungen
08/2003	Famulatur im Klinikum für Psychiatrie der CAU zu Kiel, Schwerpunkt Borderlinestörung
09/2003	Famulatur in der Praxis für Neurologie und Psychiatrie Dr. med. Godt in Kiel

Berufliche Tätigkeit

11/2005–03/2007	Assistenzärztin für Neurologie am Agnes-Karll-Krankenhaus Laatzen
04/2007–03/2010	Assistenzärztin für Neurologie am Klinikum Nord Heidberg/Hamburg
seit 04/2010	Assistenzärztin für Psychiatrie und Psychiatrie an der Sana Regio Klinik Elmshorn
18. Juli 2012	Facharztprüfung Neurologie an der Ärztchammer Schleswig-Holstein

Veröffentlichungen

Helwig U, Lammers KM, Rizzello F, Brigidi P, Rohleder V, Caramelli E, Gionchetti P, Schrezenmeir J, Foelsch UR, Schreiber S, und Campieri M. (2006) *Lactobacilli*, *bifidobacteria* and *E. coli Nissle* induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. World J Gastroenterol. 7;12(37):5978-86. PMID: 17009396.

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Angabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des verwendeten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich diese Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um eine Zulassung zur Promotion beworben habe.